



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dep. de Ciència Animal

Anàlisi genòmic i transcriptòmic del metabolisme energètic i
la resposta a l'estrès

Treball Fi de Màster

Màster Universitari en Millora Genètica Animal i Biotecnologia de la
Reproducció

AUTOR/A: Zárate Pinedo, Elisa

Tutor/a: Vicente Antón, José Salvador

Cotutor/a extern: Folch Albareda, Josep M^a

Director/a Experimental: Ballester Devis, María

CURS ACADÈMIC: 2023/2024

Treball de fi de màster

Màster en millora genètica animal i biotecnologia
de la reproducció

Anàlisi genòmic i transcriptòmic del metabolisme energètic i la resposta a l'estrès

Curs 2023/2024

Elisa Zárate Pinedo

Supervisors:

Dr. Josep Maria Folch Albareda

Dra. Maria Ballester Devis



AGRAÏMENTS

En primer lloc agraeixo sincerament als meus dos supervisors de tesis, Josep Maria Folch i Maria Ballester, el seu acompanyament, ajuda, paciència i consells durant aquest temps. La seva guia i recolzament ha estat fonamental per a la realització del treball.

A en Ferran, per estar al meu costat des del primer dia i sempre estar disposat a ajudar-me amb qualsevol cosa que necessités. Hagués sigut molt més difícil sense tu.

A l'Anna, per tenir tota la paciència del món amb mi al laboratori, i sempre tenir un moment per escoltar-me i tenir unes paraules d'ànim i esperança.

A la Betlem i l'Olga, per la seva disposició i ajuda al laboratori.

A les companyes de grup, Cristina, Miao, Liu i Magí, així com a tota la gent del CRAG que ha fet aquest camí més amè i plàcid.

A en Teo, i tota la gent del IRTA, per la seva ajuda sempre que l'he necessitada.

A Ana, Irene y Ana, por hacer de esto un camino mucho mas fácil, des de el primer dia hasta el último. Gracias chicas, sin vosotras hubiese sido todo mas difícil, y menos divertido. Me quedo con todo lo que hemos aprendido juntas.

A la meva família, l'Armand i les meves amigues, que m'han aguantat i animat durant tot aquest temps .

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	11
<i>Indústria porcina</i>	11
<i>Caràcters d'interès a la indústria porcina</i>	12
Qualitat de la carn.....	12
Salut animal.....	13
<i>Genòmica</i>	13
Marcadors genètics.....	15
Identificació Genètica de Loci de Caràcters Quantitatius: GWAS i QTLs.....	15
Aplicació d'altres òmiques: Transcriptòmica	16
<i>Metabolisme lipídic</i>	17
<i>Metabolisme d'hormones esteroidals</i>	18
OBJECTIUS.....	22
MATERIAL I MÈTODES	23
<i>Material animal</i>	23
GWAS	24
<i>Anàlisis de gens diferencialment expressats</i>	24
<i>PCR quantitativa en temps real</i>	26
<i>Anotació de polimorfismes i isoformes del gen SERPINA6</i>	28
<i>Detecció CBG porcina amb kit ELISA</i>	28
RESULTATS I DISCUSSIÓ	30
<i>Estudis d'associació</i>	30
<i>Anàlisis de gens candidats</i>	33
SERPINA6.....	33
GATA3	49
CONCLUSIONS.....	51
BIBLIOGRAFIA	52

El context actual en la producció porcina, amb la restricció en l'ús d'antimicrobians, la demanda dels consumidors de productes més saludables i nutritius i el desenvolupament de sistemes de producció més sostenibles, representen nous reptes per a la indústria porcina. En aquest escenari, la identificació de marcadors genètics i/o biomarcadors per a la selecció de característiques relacionades amb la salut i benestar animal ha esdevingut un dels objectius prioritaris per a la indústria porcina. Aquest estudi investiga la base genòmica i transcriptòmica del metabolisme energètic i la resposta a l'estrès en porcs, amb l'objectiu d'identificar i caracteritzar els gens candidats i els polimorfismes genètics associats amb els nivells hormonals de cortisol i 11-dehydrocorticosterona en sang, així com amb la ràtio d'àcids grassos araquidònic/dihomo- γ -linolènic en teixit adipós. Amb aquest objectiu, s'han analitzat 432 animals Duroc de la població IMMUPIGEN utilitzant eines genòmiques. Estudis previs de GWAS en el nostre grup van identificar més de cinquanta gens candidats per als caràcters d'estrès i metabolisme energètic. En aquest treball s'han avaluat funcionalment els gens candidats clau, *SERPINA6*, que codifica per a la proteïna transportadora de cortisol (CBG) i *GATA3*, que codifica per a la proteïna homònima, GATA3.

Mitjançant l'estudi GWAS s'ha identificat una regió del cromosoma SSC7 associada amb els nivells de cortisol i 11-dehydrocorticosterona (11-DHC) en plasma, que conté el gen candidat *SERPINA6*. A més, amb un eGWAS realitzat amb dades de RNA-Seq s'ha detectat un eQTL per l'expressió en fetge de la *SERPINA6* en la mateixa regió del cromosoma SSC7. Malgrat la col-localització del QTL i el eQTL, no s'ha observat una correlació clara entre els nivells d'expressió de *SERPINA6* en fetge i el cortisol en sang, suggerint la presència de mecanismes de regulació post-transcripcionals. Els estudis a nivell de proteïna CBG (producte del gen *SERPINA6*) en plasma van mostrar una relació inversa amb l'expressió del gen *SERPINA6* en fetge, suggerint possibles mecanismes de retroalimentació. L'anàlisi d'expressió del gen *GATA3* en teixit adipós, mitjançant qPCR, no va mostrar diferències significatives entre dos grups d'animals divergents per a la ràtio araquidònic/dihomo- γ -linolènic. Aquest estudi proporciona noves perspectives

sobre els mecanismes moleculars reguladors del metabolisme energètic i la resposta a l'estrès en porcs.

Paraules claus: GWAS, transcriptòmica, *GATA3*, *CBG*, *SERPINA6*, cortisol, porcs, estrès, metabolisme energètic.

The current context in pork production, with restrictions on the use of antimicrobials, consumer demand for healthier and more nutritious products, and the development of more sustainable production systems, represent new challenges for the pork industry. In this scenario, the identification of genetic markers and/or biomarkers for selecting traits related to animal health and welfare has become one of the industry's top priorities. This study investigates the genomic and transcriptomic basis of energy metabolism and stress response in pigs, aiming to identify and characterize candidate genes and genetic polymorphisms associated with hormone levels of cortisol and 11-dehydrocorticosterone in blood, as well as with the arachidonic acid/dihomo- γ -linolenic acid ratio in adipose tissue. To achieve this, 432 Duroc animals from the IMMUPIGEN population were analyzed using genomic tools. Previous GWAS studies in our group identified more than fifty candidate genes for stress and energy metabolism traits. This work functionally evaluates key candidate genes, *SERPINA6*, encoding the cortisol-binding globulin (CBG) protein, and *GATA3*, encoding the homonymous protein, GATA3.

Through a GWAS study, a region on chromosome SSC7 associated with plasma levels of cortisol and 11-dehydrocorticosterone (11-DHC) has been identified, containing the candidate gene *SERPINA6*. Additionally, an eGWAS conducted with RNA-Seq data has detected an eQTL for the expression of *SERPINA6* in the liver within the same region of chromosome SSC7. Despite the colocalization of the QTL and eQTL, no clear correlation has been observed between *SERPINA6* expression levels in the liver and blood cortisol levels, suggesting the presence of post-transcriptional regulation mechanisms. Protein-level studies of CBG (the product of the *SERPINA6* gene) in plasma showed an inverse relationship with *SERPINA6* gene expression in the liver, suggesting possible feedback mechanisms. The expression analysis of the *GATA3* gene in adipose tissue, using qPCR, showed no significant differences between two groups of animals divergent for the arachidonic/dihomo- γ -linolenic ratio. This study provides new insights into the molecular regulatory mechanisms of energy metabolism and stress response in pigs.

Keywords: GWAS, transcriptomics, *GATA3*, CBG, *SERPINA6*, cortisol, pigs, stress, energy metabolism.

El contexto actual en la producción porcina, con la restricción en el uso de antimicrobianos, la demanda de los consumidores de productos más saludables y nutritivos, y el desarrollo de sistemas de producción más sostenibles, representan nuevos retos para la industria porcina. En este escenario, la identificación de marcadores genéticos y/o biomarcadores para la selección de características relacionadas con la salud y el bienestar animal se ha convertido en uno de los objetivos prioritarios para la industria porcina. Este estudio investiga la base genómica y transcriptómica del metabolismo energético y la respuesta al estrés en cerdos, con el objetivo de identificar y caracterizar los genes candidatos y los polimorfismos genéticos asociados con los niveles hormonales de cortisol y 11-dehidrocorticosterona en sangre, así como con la ratio de ácido araquidónico/ácido dihomo- γ -linolénico en tejido adiposo. Con este fin, se han analizado 432 animales Duroc de la población IMMUPIGEN utilizando herramientas genómicas. Estudios previos de GWAS en nuestro grupo identificaron más de cincuenta genes candidatos para los caracteres de estrés y metabolismo energético. En este trabajo se han evaluado funcionalmente los genes candidatos clave, *SERPINA6*, que codifica para la proteína transportadora de cortisol (CBG), y *GATA3*, que codifica para la proteína homónima, GATA3.

Mediante un estudio GWAS, se ha identificado una región en el cromosoma SSC7 asociada con los niveles de cortisol y 11-dehidrocorticosterona (11-DHC) en plasma, que contiene el gen candidato *SERPINA6*. Además, con un eGWAS realizado con datos de RNA-Seq, se ha detectado un eQTL para la expresión en hígado de *SERPINA6* en la misma región del cromosoma SSC7. A pesar de la colocación del QTL y el eQTL, no se ha observado una correlación clara entre los niveles de expresión de *SERPINA6* en hígado y el cortisol en sangre, lo que sugiere la presencia de mecanismos de regulación post-transcripcionales. Los estudios a nivel de proteína CBG (producto del gen *SERPINA6*) en plasma mostraron una relación inversa con la expresión del gen *SERPINA6* en hígado, sugiriendo posibles mecanismos de retroalimentación. El análisis de expresión del gen *GATA3* en tejido adiposo, mediante qPCR, no mostró diferencias significativas entre dos grupos de animales divergentes para la ratio araquidónico/dihomo- γ -linolénico. Este

estudio proporciona nuevas perspectivas sobre los mecanismos moleculares reguladores del metabolismo energético y la respuesta al estrés en cerdos..

Palabras clave: GWAS, transcriptómica, *GATA3*, CBG, *SERPINA6*, cortisol, cerdos, estrés, metabolismo energético.

El sector porcí té una importància clau en l'economia, tant a nivell nacional, com mundial. Durant els últims anys el sector ha crescut notòriament, en producció, cens, i nombre d'explotacions. El desenvolupament d'un sistema productiu intensiu i altament tecnificat ha fet possible l'accés dels consumidors a carns de porc i altres productes processats assequibles i segurs. El porc és el segon producte càrnic més consumit mundialment, només per darrera del pollastre (European Parliamentary Research Service, 2020).

A nivell mundial, la Unió Europea és el segon productor de porcí amb un 22%, després de la Xina, que produeix un 44%. A Europa, els dos principals productors són Espanya i Alemanya, seguits de França, aquests tres països representen més de la meitat de la producció total europea (Figura 1). Espanya se situa en tercer lloc a nivell mundial.

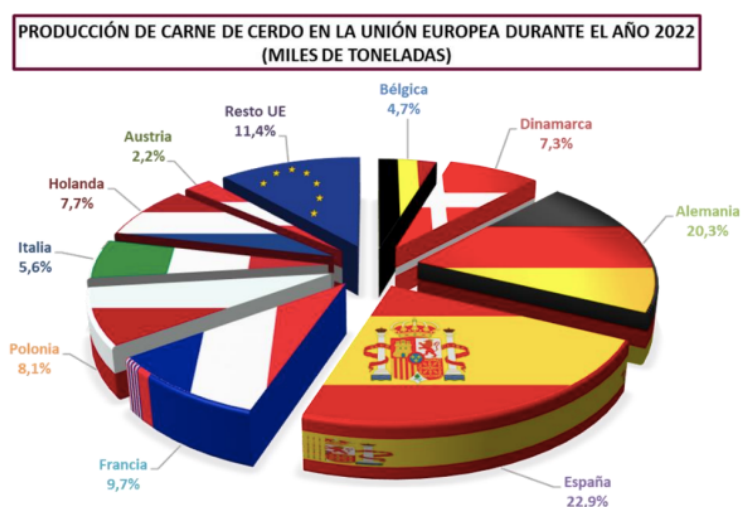


Figura 1. Producció de carn de porc en la Unió Europea (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (c) 2023)

Malgrat la tendència a l'alta del sector durant la última dècada, les dades relatives a l'any 2022 situen, per primera vegada, la producció de carn de porcí a nivell nacional en descens. Durant l'any 2022, la producció va descendir al voltant d'un 2,5%, revertint la tendència dels darrers anys. A més, l'exportació de carn porcina espanyola

també va experimentar un descens del 5,4% respecte l'any anterior. Aquest descens ha estat marcat per incerteses al mercat degudes a malalties, com la PPA (pesta porcina africana) o el PRSS (Síndrome Respiratori i Reproductiu Porcí) (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (c) 2023).

Catalunya és el principal productor de porcí a nivell Espanyol, arreu del territori es troben més de 5.000 explotacions ramaderes i al 2022 es van sacrificar més de 20.000.000 de caps de bestiar, representant al voltant d'un 20% de la producció total d'Espanya (Generalitat de Catalunya, 2023).

Caràcters d'interès a la indústria porcina

Qualitat de la carn

La qualitat de la carn és un caràcter important per als programes de cria de porcs que tenen com a objectiu satisfer les demandes dels consumidors. Estudis anteriors han mostrat que la majoria dels indicadors de qualitat de la carn són caràcters amb una heretabilitat baixa a moderada (Lopez et al., 2020); per tant, millorar la qualitat de la carn utilitzant tècniques convencionals, com la selecció genètica, els entrecreuaments entre races o l'alimentació,, segueix sent un repte.

La qualitat de la carn és un indicador complet que inclou la humitat, el greix intramuscular (IMF), el pH, el color, la capacitat de retenció d'aigua, el marblejat, i la tendresa, entre d'altres paràmetres (Miller, 2002). Històricament, els esforços de recerca en la genètica porcina es van centrar en el rendiment de creixement deixant de banda la qualitat de la carn. No obstant això, a mesura que milloren els estàndards de vida a nivell mundial, els consumidors prioritzen la qualitat de la carn. En conseqüència, els productors de porcs estan interessats en millorar la qualitat de la carn per satisfer les noves demandes del mercat (Gao et al., 2021).

La composició lipídica és un altre factor crucial que influeix en la qualitat de la carn. Els lípids intramusculars, principalment el greix intramuscular (IMF), contribueixen significativament al sabor, la suculència i la textura de la carn. La composició dels àcids

grassos dins del greix intramuscular també afecta la seva qualitat (Wood et al., 2008). Els àcids grassos saturats i insaturats tenen diferents efectes sobre la salut humana, amb un major contingut d'àcids grassos insaturats considerats més beneficiosos per a la salut cardiovascular. A més, la proporció d'àcids grassos omega-3 i omega-6 és important no només per a la salut humana, sinó també per a les propietats sensorials de la carn.(Nong et al., 2020)

Salut animal

La intensificació i globalització de la producció porcina i l'augment de les poblacions han portat nous reptes relacionats amb la salut animal i la sostenibilitat de la producció. Per a mantenir els alts estàndards de salut, les granges van començar a dependre de protocols de salut estrictes i la utilització continuada d'antibiòtics. L'ús excessiu d'antibiòtics ha derivat en un augment de les resistències antimicrobianes, un problema que afecta tant a la salut animal com la salut pública (Lekagul et al., 2019).

Com a resposta als nous reptes, apart dels mètodes convencionals de vacunació i mesures estrictes de biocontenció, actualment s'estan desenvolupant mètodes alternatius per al control de la salut, com la implementació de prebiòtics i probiòtics, immunoestimuladors, la generació de vacunes alternatives i/o la implementació de mesures més restrictives en la gestió del bestiar. A més a més, la incorporació de caràcters de salut i benestar en els programes de selecció genètica/genòmica amb la finalitat de produir animals més robustos i resistents a malalties ha esdevingut una prioritat en la indústria porcina (Millet and Maertens 2011; Nowakiewicz et al., 2020)

Genòmica

Els avenços tecnològics en els darrers anys en el camp de la genètica i la genòmica han tingut un impacte significatiu en la millora genètica porcina. Aquests avenços han permès una considerable millora en la productivitat i rentabilitat dels animals, gràcies a

la implementació de tecnologies aplicades a la selecció genòmica i l'ús de dades genòmiques en programes de millora.

La selecció genòmica es basa en el genotipat de marcadors genètics arreu del genoma, per tal de predir el valor genètic dels animals, sense necessitat d'esperar a que aquest animal tingui dades productives ni descendència. Aquesta metodologia agilitza i abarateix el procés de millora genètica, utilitzant un model infinitesimal que assumeix que les característiques d'interès estan influenciades per molts gens amb efectes petits, com la resistència a malalties o la qualitat de la carn. Aquesta tècnica també incorpora fenotips observables, com el pes o la supervivència, per millorar la precisió de les prediccions genètiques i facilitar una selecció més eficient i precisa dels animals per a la millora genètica.

Al 2003, es va iniciar la seqüenciació del genoma porcí per el Consorci de seqüenciació del genoma porcí (SGSC), obtenint la seqüenciació total del genoma al 2012 (Groenen et al., 2012). La seqüenciació completa es va realitzar mitjançant diferents metodologies de seqüenciació, primerament seqüenciació de *Sanger* i posteriorment amb metodologies de seqüenciació de nova generació (NGS; *Next Generation Sequencing*). El genoma porcí té una mida aproximada de 2.7 Gb, el que el situa entre els genomes més grans dels mamífers, organitzat en 18 parells de cromosomes autosòmics i un parell de cromosomes sexuals, 38 cromosomes en total. Conté aproximadament entre 21,000-23,000 gens codificadors (Martin et al., 2023).

Gràcies a les metodologies de NGS s'ha facilitat la identificació de polimorfismes creant una base de dades amb més de 70 milions de variants del genoma porcí, com ara SNPs, insercions o delecions (Martin et al., 2023). El primer microxip de genotipat per a tot el genoma es va comercialitzar al 2008; el PorcineSNP60 BeadChip (Illumina) que conté 62,163 polimorfismes d'arreu del genoma. Als anys 2000 es van desenvolupar tecnologies de microarrays personalitzats, com els *Fluidigm Dynamic Arrays* (Fluidigm, Standard Biotools), que utilitzen tecnologia de fluids en nanolitres, o la tecnologia *OpenArray* amb sondes *TaqMan* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Els marcadors genètics són variacions en el DNA en *loci* específics, fonamentals per a la genòmica ja que proporcionen punts de referència al llarg del genoma, que serveixen per estudiar la variació genètica i la relació amb característiques fenotípiques. Alguns exemples de marcadors genètics són els SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), els microsatèl·lits, els indels (insercions i delecions), els CNVs (variants en el nombre de còpies; Copy Number Variants) entre altres.

Els SNPs o polimorfisme de nucleòtid simple són els marcadors més abundants i robustos, els converteix en marcadors molt favorables per determinar la diversitat i relacions genètiques. Milloren la selecció de materials de cria i ajuden a descobrir nous gens associats a caràcters d'interès econòmic (Virgu et al., 2023).

Identificació Genètica de Loci de Caràcters Quantitatius: GWAS i QTLs

En l'àmbit de la genètica porcina, els estudis d'associació a nivell del genoma (GWAS, sigles en anglès: genome-wide association study) i els *loci* de caràcters quantitatius (QTL, sigles en anglès: quantitative trait *locus*) tenen un paper important en la identificació de variacions genètiques associades amb característiques fenotípiques d'interès. Els QTLs són regions específiques en el genoma que estan associades amb la variació d'un caràcter quantitatiu, que varia de forma continua i pot estar determinat per múltiples gens i factors ambientals. L'anàlisi de QTL implica la associació amb el caràcter de marcadors genètics pròxims o lligats al *locus* causal, i que per tant segreguen conjuntament en una població o encreuament.

Els estudis de QTL en porcs s'han dut a terme durant els últims trenta anys. Al 1994 es va identificar un QTL associat amb la taxa de creixement i greix en el cromosoma porcí 4 (SSC4) (Andersson et al., 1994). A partir d'aquest descobriment inicial, s'han documentat milers de QTLs associats amb diversos caràcters en porcs. La base de dades "The Pig QTLdb" consta de 23,273 QTLs, abastant 681 caràcters diferents distribuïts al llarg del genoma (Hu et al., 2005).

Els estudis GWAS apliquen models lineals entre el fenotip d'interès i cada marcador genètic, per tal de detectar associacions amb el caràcter estudiat. Els GWAS es basen en analitzar milers o milions de variants genètiques al llarg del genoma per identificar aquelles variants genètiques associades amb el caràcter d'interès estudiat. Hi ha múltiples estudis basats en GWAS on s'han identificat variants i reguladors gènics que afecten a la composició d'àcids grassos (Corominas et al., 2015; Puig-Oliveras et al., 2016), així com d'altres on s'identifica com diferents regions genòmiques estan associades amb concentracions d'androsterona i altres hormones (Faggion et al., 2023). Els resultats del GWAS es poden aplicar àmpliament per a la comprensió de l'arquitectura genètica dels caràcters d'interès.

El GWAS d'expressió (eGWAS; expression genome-wide association study) és un mètode d'anàlisi genètic que investiga l'associació entre polimorfismes genètics, com ara SNPs, i els nivells d'expressió gènica. L'objectiu del eGWAS és identificar variants genètiques reguladores que influeixin en l'expressió gènica, elucidant els mecanismes moleculars subjacents a diferents caràcters. Mitjançant la utilització de l'abundància de transcrits d'ARN missatger com a representació fenotípica d'interès, és possible mesurar quantitativament l'impacte de les variants reguladores en una escala contínua. Aquest anàlisi pot identificar QTLs d'expressió gènica (eQTLs), que són regions genòmiques associades amb la variació de l'expressió gènica.

Aplicació d'altres òmiques: Transcriptòmica

La transcriptòmica és l'estudi del transcriptoma, el conjunt complet de transcrits d'ARN produïts pel genoma, sota circumstàncies específiques o en una cèl·lula específica, utilitzant mètodes d'alt rendiment com la seqüenciació massiva o altres mètodes de rendiment mitjà com les plataformes d'*OpenArray* (Thermo Fisher Scientific) o *Fluidigm* (Standard BioTools).

Un dels principals mètodes actuals d'anàlisi del transcriptoma es el RNA-Seq, que es basa en la seqüenciació massiva d'ARN. Es va desenvolupar fa més d'una dècada i, des de llavors, s'ha convertit en una eina fonamental en la biologia molecular,

contribuint significativament a la nostra comprensió de la funció genòmica. Aquesta, permet la caracterització del transcriptoma, incloent la identificació dels llocs de processament dels exons, promotors alternatius, llocs de poliadenilació, ARNs no codificants (ncRNAs), polimorfismes en regions codificants i elements transposables.

La comparació de transcriptomes entre animals fenotípicament divergents, moments fisiològics, en resposta a diferents tractaments o entre diferents poblacions cel·lulars permet la identificació de gens que s'expressen diferencialment. Les eines d'anàlisi de l'expressió gènica diferencial (DGE), com el *DESeq2* o el *edgeR*, realitzen proves estadístiques basades en la quantificació de gens expressats, derivats de les anàlisis computacionals de lectures crues de RNA-Seq, per determinar quins gens tenen una diferència estadísticament significativa. També proporcionen informació relacionada amb el nivell d'expressió i la magnitud de la diferència per parells per a cada gen. Les anàlisis de DGE poden proporcionar una considerable comprensió dels mecanismes genètics i processos biològics que contribueixen a les diferències fenotípiques.

Metabolisme lipídic

El metabolisme lipídic juga un paper important en la salut i la eficiència productiva dels animals. Aquest, influeix en la composició corporal, com per exemple la relació múscul / greix que es un caràcter fonamental, tant per a la qualitat de la carn com per a la eficiència (Hernandez-Patlan et al., 2023). Els animals amb un metabolisme lipídic eficient tenen millors perfils de greix corporal, el que millora la resistència a malalties i la capacitat d'aquests de recuperar-se després de patir una malaltia o estrès (Maradonna and Carnevali 2018). A més, el metabolisme lipídic també està relacionat amb la producció d'energia i regulació de processos inflamatoris. Un metabolisme lipídic equilibrat afavoreix una millor resposta immunitària (Poklucar et al., 2020)

El metabolisme dels àcids grassos està regulat principalment per tres òrgans clau: el fetge, el teixit adipós i el múscul esquelètic. El fetge exerceix una funció altament especialitzada en diverses rutes metabòliques, sent responsable en els porcs de la síntesi

de novo de colesterol, així com de l'oxidació i la biosíntesi d'àcids grassos (Ramayo-Caldas et al., 2012). D'altra banda, el teixit adipós juga un paper fonamental en la biosíntesi i l'emmagatzematge d'àcids grassos, a més de la producció d'adipocitoquines, un grup d'hormones que regulen el metabolisme energètic. Pel que fa al múscul esquelètic dels porcs, aquest és el lloc on els àcids grassos, procedents tant del fetge com del teixit adipós, s'emmagatzemen en forma de greix intramuscular (IMF) per a ser utilitzats com a font d'energia per les cèl·lules musculars, que presenten un alt consum energètic (Puig-Oliveras et al., 2014).

El metabolisme lipídic està altament regulat per una complexa xarxa de gens i vies metabòliques que interactuen per a mantenir la homeòstasis lipídica en l'organisme. La regulació genètica inclou la transcripció i traducció així com també l'activitat enzimàtica i la modulació per factors ambientals i hormonals (Wang et al., 2022). Dins de la regulació transcripcional trobem factors de transcripció que juguen un paper clau, com els PPARs (receptors activats per proliferadors peroxisomals) o el GATA3, regulador negatiu de marcadors de diferenciació dels adipòcits (Valdés-Hernández et al., 2023; L. Wang et al., 2022). També hi tenen un paper important en la regulació les hormones; la insulina, per exemple, estimula la síntesis de lípids mentre que el glucagó promou la mobilització d'aquests per l'ús com a font d'energia (Poklucar et al., 2020).

A més, les vies metabòliques implicades en el metabolisme dels àcids grassos, incloent-hi la lipòlisi o la β -oxidació dels àcids grassos (AG) i la lipogènesi o la síntesi de nou dels AG, estan influenciades per l'estat nutricional de l'individu i poden ser modificades en conseqüència (Frühbeck et al., 2014).

Metabolisme d'hormones esteroidals

El metabolisme de les hormones esteroidals en porcs es un procés complex i altament regulat, que exerceix un paper crucial en una gran varietat de funcions fisiològiques, com el desenvolupament sexual, el comportament, el metabolisme energètic i la resposta a l'estrès (Osorioa et al., 2013). És imprescindible que la síntesis,

així com el metabolisme i l'eliminació de les hormones esteroidals estigui en equilibri per a un correcte funcionament de les funcions fisiològiques.

Les hormones esteroidals son principalment sintetitzades a les glàndules suprarenals i els testicles. A la figura 2 es mostra una representació esquemàtica del metabolisme d'hormones esteroidals, incloent les principals vies de síntesi i transformació.

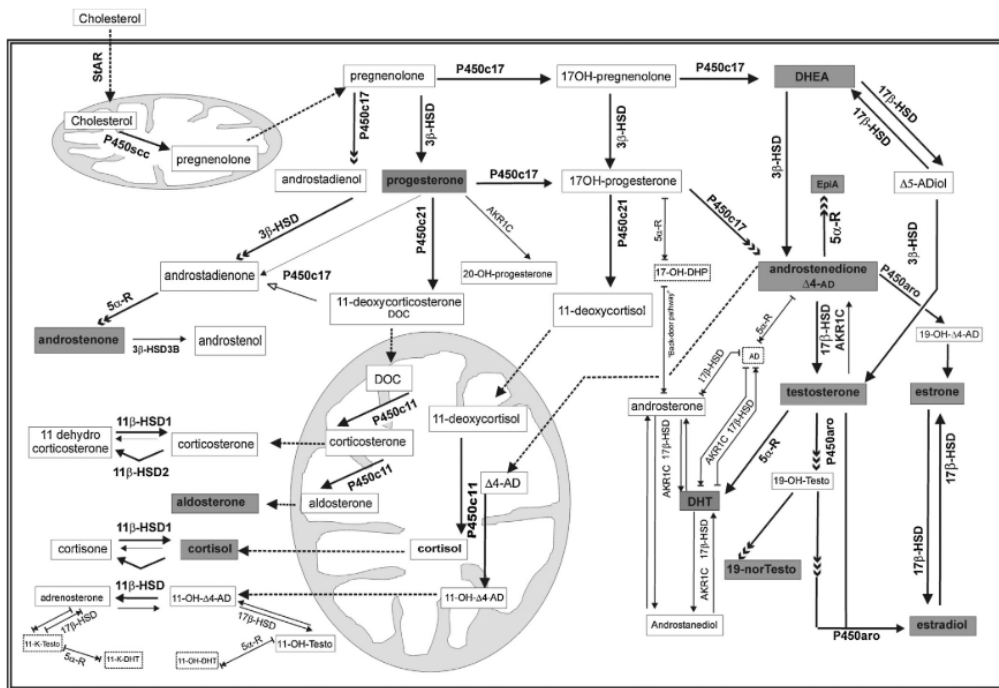


Figura 2. Vies involucrades en la biosíntesi d'hormones esteroidals en porcs. (Robic et al., 2014).

Un desequilibri en la producció d'hormones pot tenir conseqüències per a la producció de la carn, per exemple, una alta concentració d'androsterona produeix un gust desagradable a la carn per als consumidors (Groenen et al., 2012; Poklukar et al., 2020).

Totes les hormones esteroidals se sintetitzen a partir del colesterol i, conseqüentment, tenen estructures estretament relacionades. El colesterol consta de 27 carbonis distribuïts en 4 anells i una cadena lateral de 6 carbonis (C27). El primer pas de la esteroidogènesis consisteix en l'escissió de la cadena lateral per a la síntesi de pregnenolona (C21). Aquesta, pot convertir-se en progesterona o en 17-OH-progesterona, tots dos C21. Ambdues molècules son precursoros dels tres principals

grups d'hormones esteroidals; corticoides (C21), andrògens (C19) i estrògens (C18), comunes a tots els mamífers. El tipus d'esteroides produïts per una glàndula en particular està determinat per les activitats de transcripció dels gens codificadors per enzims esteroidogènics i per la disponibilitat de substrats o cofactors (Robic et al., 2014).

Hi ha molts gens implicats amb la síntesis d'aquest grup d'hormones; gens CYP, gens que codifiquen per a enzims oxidatius (citocrom P450), encarregats de catalitzar la majoria de reaccions esteroidogèniques. També presenten un paper important les hidroxистерoid deshidrogenases, que catalitzen reaccions reversibles i poden actuar en qualsevol direcció (oxidació / reducció) sota les condicions necessàries. Aquests enzims juguen un paper crucial en la biosíntesis i el metabolisme.

Cortisol

El cortisol es una hormona que juga un paper clau en el metabolisme porcí; està altament implicada en processos biològics com la gluconeogènesis, el metabolisme lipídic i de proteïnes, l'acció antiinflamatòria i el creixement (Tempel and Leibowitz 1994) (Elenkov et al., 1999).

A més, és un component principal de la resposta a l'estrès, mitjançant l'activació de l'eix hipotalàmic-hipofisari-suprarenal (HPA) en situacions d'estrès, com el deslletament on els garrins afronten canvis d'alimentació, donant lloc a l'alliberació de cortisol des del còrtex suprarenal (Romo-Valdez et al., 2022).

A un estudi publicat per Ballester et al., (2020) es mostra que els nivells de cortisol en pèl tenen una heretabilitat moderada-alta, el que indica que la variació genètica juga un paper important en la seva regulació. També, s'han descrit correlacions significatives entre els nivells de cortisol i diferents caràcters productius i immunològics; uns alts nivells de cortisol poden estar associats amb una menor eficiència de creixement i un impacte negatiu a la qualitat de la carn, així com també influeixen en la resposta immune afectant la susceptibilitat a malalties i el benestar general dels animals (Ballester et al.,

2020). En altres estudis també s'ha descrit que els nivells de cortisol en sang post-ACTH (hormona adrenocorticotropa) tenen heretabilitats altes (Larzul et al., 2015)

Tan sols el 5% del cortisol total en sang està en la seva forma lliure activa, el 95% restant està unit a proteïnes plasmàtiques, principalment a la hormona transportadora de cortisol, *corticosteroid-binding globulin (CBG)*. En situacions d'estrès el cortisol és alliberat ràpidament i, posteriorment, per control de feedback negatiu, els nivells de cortisol tornen a valors basals quan la resposta està controlada. Si aquest procés es desregula pot derivar en diverses patologies com obesitat, reaccions autoimmunes, etc (McEwen and Wingfield 2003).

La proteïna transportadora de cortisol, CBG, és sintetitzada majoritàriament en el fetge i secretada en sang, tot i que també s'ha detectat expressió de mRNA en ronyó, testicle, i pulmó. La CBG és una glicoproteïna monomèrica de 50 a 60 kDa amb un únic lloc d'unió per als glucocorticoides (Henley et al., 2016). Està codificada per un únic gen, la *SERPINA 6*, pertanyent a la família de les serpins, família de inhibidors de proteases, on hi trobem també, per exemple, la Alpha-1-Antitripsina (*SERPINA 1*) (Law et al., 2006).

En humans, s'han descrit diverses mutacions en el gen *SERPINA6*, aquestes mutacions porten a alteracions de l'estructura i funció de la proteïna que poden resultar en una disminució dels nivells de CBG en plasma (Torpy et al., 2001) o en una disminució en l'afinitat i capacitat d'unió al cortisol (Torpy et al., 2012). Aquestes alteracions en la proteïna son causants de problemes de salut en humans com hipoglicèmica, intolerància a l'exercici, fatiga crònica i hipotensió (Meyer et al., 2021).

En porcs, la *SERPINA 6* es troba al cromosoma 7, consta de 5 exons, amb el codó d'inici ATG en el segon exó (Martin et al., 2023). En un estudi del 2004 es va suggerir el gen *CBG* com a gen causal del QTL associat amb nivells de cortisol, greix i contingut de múscul en una població entrecreuada de Meishan i Large White (Ousova et al., 2004). Posteriorment, el mateix grup, va identificar diferents mutacions no sinònimes que impactaven en la capacitat d'unió i en l'afinitat d'unió del CBG amb el cortisol (Guyonnet-Dupérat et al., 2006).

OBJECTIUS

L'objectiu global d'aquest treball s'engloba dintre de l'objectiu general del projecte METAPIGEN (PID2020-112677RB-C21) que consisteix en l'estudi del metabolisme energètic per tal d'identificar gens candidats i variants genètiques que influeixin en la variació fenotípica de caràcters de qualitat i salut en porcí.

Els objectius específics de l'estudi son:

1. Identificar gens candidats i polimorfismes genètics associats als nivells de cortisol i 11-Dehydrocorticosterona en sang.
2. Identificar gens candidats i polimorfismes genètics associats a la ràtio dels àcids grassos araquidònic / dihomo- γ -linolenic en teixit adipós.
3. Validar funcionalment els gens candidats *SERPINA6* i *GATA3*.

Material animal

El material animal utilitzat en aquest estudi ha estat prèviament publicat en diferents estudis dels projectes IMMUPIGEN i METAPIGEN (Ballester et al., 2020; Crespo-Piazuelo et al., 2021)

L'estudi s'ha realitzat amb dades d'un total de 432 animals (217 mascles i 215 femelles), sacrificats entre els 181 – 228 dies. Dels 432 animals es tenen dades de caràcters d'interès productiu, de salut i benestar, com la composició d'àcids grassos o la quantificació en sèrum d'hormones esteroidals.

Els porcs es van criar en les mateixes condicions i tenien accés *ad libitum* a una dieta basada en cereals i aigua. Tots els animals estaven sans i no mostraven signes d'infecció. Es va recollir sang als 60 ± 8 dies d'edat a través de la vena jugular per la determinació d'àcids grassos i hormones esteroidals.

També es van recollir mostres de teixit adipós (greix dorsal), fetge i múscul (*gluteus medius*) immediatament després del sacrifici. Les mostres de fetge es van recollir amb *RNAlater* (ThermoFisher, Espanya). Totes les mostres van ser congelades a -80 °C per a anàlisis posteriors. Aquestes mostres es van utilitzar per la determinació d'àcids grassos i/o experiments de RNA-Seq en fetge.

Els àcids grassos (AG), així com les hormones esteroidals, es van identificar i quantificar mitjançant cromatografia de gasos (GC).

Els diferents GWAS i GWAS d'expressió utilitzats i analitzats en aquest estudi formen part de treballs més amplis multicaàcter del grup de recerca (resultats no publicats).

En el cas del GWAS per als caràcters de composició lipídica i hormones esteroidals, l'estudi d'associació es va dur a terme entre 9,751,414 SNPs, imputats a nivell de genoma utilitzant els genotips del GGP Porcine HD Array (63,072 SNPs) i un panell de referència genòmica porcina (PGRPv1, PigGTE_x) de 1,602 WGS de diferents races i filtrats per MAF<0.5%, i els diferents caràcters.(Liu, et al., resultats no publicats; Jové-Juncà et al., resultats no publicats).

Els GWAS d'expressió es van fer entre els 9,751,414 SNPs imputats i filtrats i 14,554 gens (dades d'expressió en fetge, transformades en log₂CPM) (Llobet, et al., resultats no publicats).

En els tres casos es va fer servir el mateix model;

$$y_{ijk} = sex_j + b_k + u_i + s_{li}a_l + e_{ijk}$$

On, y_{ijk} correspon al fenotip de l'individu i de sexe j en el lot k ; sex correspon a l'efecte sexe, b_k correspon a l'efecte lot, u_i efecte genètic infinitesimal de l'individu, s_{li} és el genotip per al SNP l i a_l és l'efecte de substitució de l'al·lel del SNP sobre el caràcter d'estudi. e_{ijk} correspon el terme residual. Per a la mesura de la significació estadística es va utilitzar el FDR descrit per Benjamini i Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995) i el llindar de significació es va establir en $FDR \leq 0.05$.

Anàlisi de gens diferencialment expressats

Per a realitzar l'estudi d'expressió diferencial, es va agafar un grup d'animals extrems per a les hormones cortisol i 11-dehydrocorticosterona entre tota la població IMMUIGEN fenotipada. Cada grup (*high (H)* i *low (L)*) per cada una de les dues hormones constava de 12 animals, seleccionats tenint en compte el seu lot de sacrifici i

sexe. Tenint així, en cada grup extrem, un mascle i una femella de cada lot, intentant equilibrar aquest efecte.

DEG amb DEseq2

Es va realitzar un anàlisi de gens diferencialment expressats utilitzant el paquet de R DESeq2 (Love et al., 2014). L'anàlisi pren com a referència el grup amb expressió baixa (grup L)

Les dades en cru van passar per un primer filtrat per tal d'eliminar els gens amb baixa expressió i, així, reduir els falsos positius. El filtrat tan sols conserva aquells gens per damunt d'un llindar establert (10 *counts*) en més mostres que les dimensions de mostra del grup més petit (en el nostre cas, els dos grups són de la mateixa mida; 12). El disseny de l'estudi era: Expressió gènica ~ Sexe + Lot + Grup. Per tal de mesurar l'efecte del grup corregint l'efecte del lot i sexe que pugui haver dins la població.

Es van considerar gens diferencialment expressats aquells que tinguessin un FDR (α) descrit per Benjamini i Hochberg inferior a 0.05.

DEG amb edgeR

Es va realitzar un altre anàlisi de gens diferencialment expressats, utilitzant el paquet de R edgeR (Robinson et al., 2009). Es va implementar, de nou, un filtrat de gens amb baixa expressió. En aquest cas amb la funció `filterByExpr()` del paquet edgeR. També es va fer una normalització de les dades amb la funció `normLibSize()`, utilitzant el mètode de normalització TMM (Trimmed Mean of M-values). El disseny de l'anàlisi era el mateix que per DEseq2: Expressió gènica ~ Sexe + Lot + Grup.

Per a fer l'anàlisi, edgeR ofereix dues metodologies: la metodologia clàssica que consisteix en la comparació directa entre grups sense la capacitat d'incloure variables addicionals i la metodologia GLM, que utilitza un model lineal generalitzat permetent

dissenys experimentals més complexos. En aquest cas, es va optar per a utilitzar la metodologia GLM, per poder incorporar variables addicionals a part del grup.

Com en el cas de l'anàlisi amb el DESeq2, es van considerar gens diferencialment expressats aquells que tinguessin un FDR (α) descrit per Benjamini i Hochberg inferior a 0.05.

PCR quantitativa en temps real

Extracció de RNA

Per a fer la PCR quantitativa en temps real, es van fer extraccions de RNA en teixit adipós. Les extraccions es van realitzar en 24 animals, seleccionats per a fenotips extrems per a la ràtio C20:4n6/C20:3n6 (araquidònic / àcid dihomog- γ -linoleic). L'extracció es va fer seguint el protocol d'extracció i purificació de RiboPure™ RNA Purification Kit.

Es van utilitzar aproximadament 130mg de cada mostra, un cop realitzades les extraccions, el RNA es va quantificar en un Nanodrop i la integritat del RNA es va determinar en un Bioanalyzer. De les 24 mostres inicials, es van seleccionar aquelles que tenien, com a mínim, una concentració de 80 ng/ μ L, un ratio de 260/280 >2, un ratio 260/230 >1, i un RIN >5. Un total de 12 mostres van ser seleccionades per a la retrotranscripció (RT).

Retrotranscripció (RT)

Les mostres de RNA es van diluir per a aconseguir una concentració de 80 ng/ μ l per a totes elles, i es va posar 10 μ l de mostra, a un volum total de 20 μ l per a obtenir així una quantitat de 800 ng de RNA. La síntesi de cDNA es va realitzar incubant la reacció en un primer pas a 25°C durant 10 minuts, seguit d'una incubació a 37°C durant dues hores, acabant amb un pas d'inactivació de la transcriptasa inversa per calor a 85°C durant 5

minuts. La retrotranscripció es va portar a terme amb el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription.

qPCR per a *GATA3*

L'anàlisi d'expressió es va fer amb detecció amb SYBR green utilitzant SYBR® Select Master Mix.

Es van analitzar un total de 4 gens per qPCR. El gen diana de l'estudi, *GATA3*, i tres gens endògens: *ACTB*, *B2M* i *HPRT1* (Ballester et al., 2017). Els encebadors utilitzats per al gen diana *GATA3*, son F 5' GGCGAGGTCCAGCACAGA 3' i R 5' ATTCTGTCCGTTTCATTTTGTGGT 3'. Van ser dissenyats utilitzant el software PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems).

Per als 5 gens es van fer corbes estàndards amb 8 dilucions diferents (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/320, 1/1280, 1/5120) per triplicat amb un pool de 16 mostres de cDNA, per a testar l'eficiència de la reacció.

La qPCR es va fer en una placa de reacció òptica de 96 pous MicroAmp™ i totes les mostres es van analitzar per triplicat. Cada mostra contenia 1 µL de cDNA a una dilució 1/5, conjuntament amb SYBR® Select Master Mix, encebadors i aigua lliure de RNases, per a un volum final de 20 µL per pou. El perfil del termociclador va ser: un pas inicial de 2 min a 50 °C, seguit de 2 min a 95°C, i 40 cicles de 15 segons a 95°C i 1 min a 60°C.

L'anàlisi de dades es va fer utilitzant el Thermo Fisher Cloud software, amb el mètode de $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen 2001). Per a fer l'anàlisi comparatiu de mostres per grups (High o Low) es va agafar com a grup de referència el grup L. Per a l'anàlisi de mostres individualitzades es va agafar com a referència la mostra amb menor expressió.

Per identificar variants funcionalment rellevants i fer predicció de conseqüències biològiques es indispensable fer una correcta anotació de polimorfismes. En l'estudi, primerament es van extreure totes les variants genètiques del fitxer de genotips imputats dels 432 animals de la població IMMUPIGEN de la regió específica del gen *SERPINA6* utilitzant l'eina PLINK 2.0. Un cop convertides les dades a format VCF es van carregar a l'eina *Variant Effect Predictor* (VEP) del portal Ensembl per tal d'identificar mutacions amb un efecte sobre el gen i la població estudiada. Finalment, les mutacions identificades es van comprovar visualment amb dades de WGS (Whole Genome Sequence) d'alguns animals, utilitzant l'IGV (Integrative Genome Viewer) per assegurar que les mutacions estaven correctament anotades.

A més, es va comprovar si la isoforma que s'expressava en dades de transcriptòmica (RNA-Seq) de fetge de la nostra població corresponia a alguna de les isoformes anotades a la base de dades de Ensembl (*Sus scrofa* 11.1). Per a comprovar-ho, es van visualitzar les dades de RNA-Seq amb IGV, per comparar-les amb les seqüències de referència proporcionades per Ensembl. Aquesta verificació es important per assegurar que les anotacions dels gens de les bases de dades corresponen a les observades en les mostres de teixit reals.

Detecció CBG porcina amb kit ELISA

Per a determinar quantitativament la proteïna CBG es va realitzar la tècnica d'ELISA utilitzant el kit Porcine Corticosteroid Binding Globulin (CBG) ELISA kit (MyBioSource).

L'experiment es va portar a terme amb mostres de plasma de 36 animals, seleccionats per a dos fenotips diferents. Per una banda, hi havia animals seleccionats per al fenotip extrem de nivells de cortisol en sang. Per altra banda, hi havia animals seleccionats per al fenotip extrem d'expressió de *SERPINA6* en fetge. Es van seleccionar 18 animals per cada fenotip, nou de cada grup extrem. Les mostres de plasma d'aquests animals estaven emmagatzemades a -80°C.

L'experiment es va realitzar en una placa de 96 pous, seguint les instruccions del protocol de la casa comercial. Totes les mostres estaven a una dilució $\frac{1}{4}$, i es van posar per duplicat.

La quantificació de les mostres es va fer interpolant la seva absorbància a partir de les corbes estàndard construïdes amb mostres amb concentracions conegudes proporcionades pel KIT (0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL). L'absorbància es va llegir a una longitud d'ona de 450 nm amb el lector de plaques Lumistar Omega (BMG Labtech) i l'anàlisi de dades es va fer amb el software Omega-Data analysis.

Primerament, es va dur a terme l'estudi del cortisol en plasma, atès el paper crític d'aquesta hormona en diverses vies fisiològiques i patològiques. La selecció del cortisol com a caràcter d'interès es va basar en la seva rellevància biològica com a indicador del funcionament del sistema de resposta al estrès i dels processos metabòlics.

El GWAS del cortisol va identificar un sol QTL (quantitative trait locus) significatiu associat amb els nivells de cortisol en plasma, tal com s'observa al *Manhattan plot* que es mostra a la Figura 3. Aquest QTL es troba al final del cromosoma 7 porcí (SSC7), entre les posicions 109,702,875 pb i 117,670,828 pb, sent el SNP més significatiu el que es troba a la posició 115,637,925 pb (rs3474839334) i presenta un p-valor de 2.63×10^{-11} .

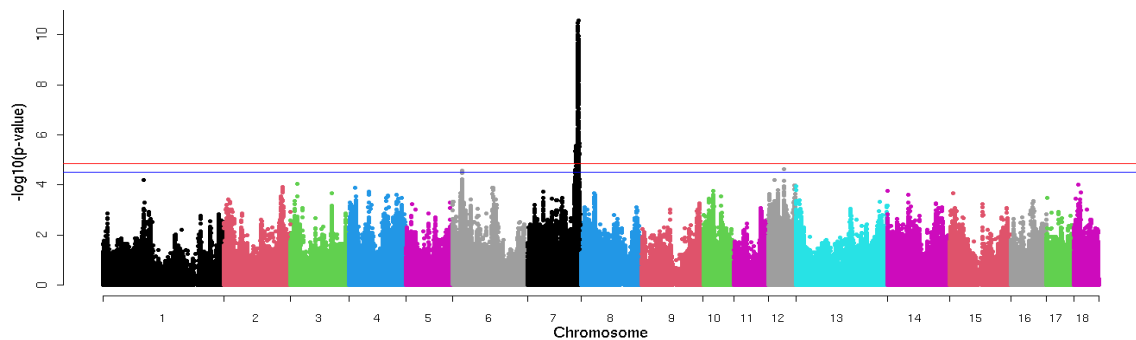


Figura 3. Manhattan plot que representa l'anàlisi d'associació entre els nivells de cortisol en plasma i els SNPs distribuïts al llarg del genoma del porc. La línia vermella indica el llindar de significació a nivell genòmic.

Els polimorfismes ($n=1,115$) més significatius es troben al voltant de la regió 115-116 Mb del SSC7. En aquesta regió hi ha anotats diversos gens, entre ells alguns de la família de les serpines.

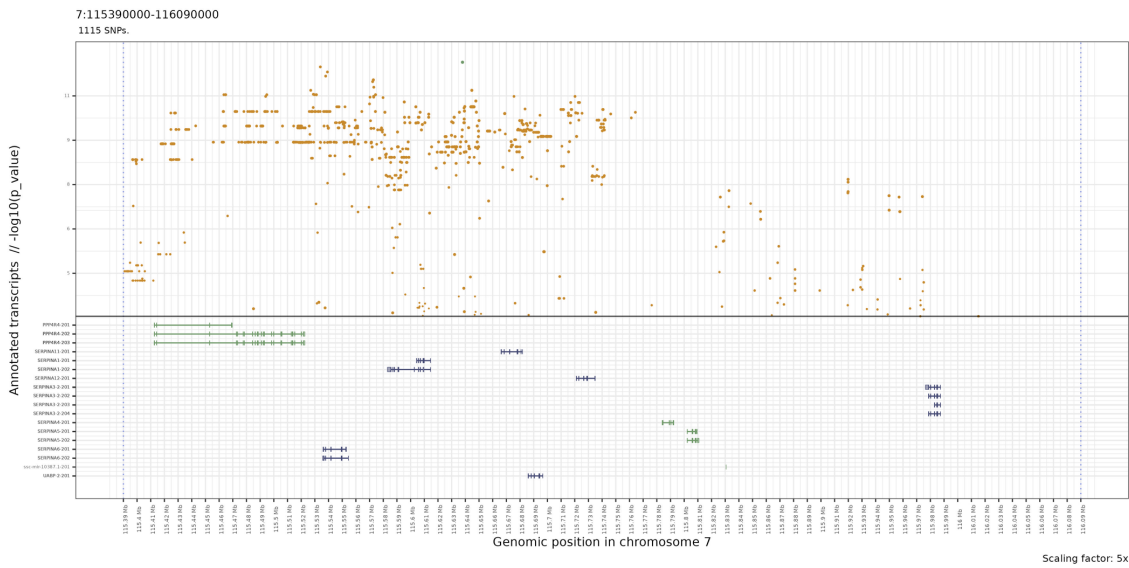


Figura 4. Representació gràfica de la regió genòmica pertanyent al QTL del cortisol. A la part superior es troben graficats amb punts els polimorfismes, en verd, el més significatiu. A l'eix de la Y apareixen els diferents gens anotats en aquesta regió i a l'eix de les X la regió en Mb.

També es va analitzar el GWAS d'una altra hormona, la 11-dehidrocorticosterona (11-DHC), un metabòlit de la corticosterona que comparteix via metabòlica amb el cortisol. Tot i que hi ha menys estudis publicats sobre aquesta hormona en comparació amb el cortisol, s'ha demostrat que juga un paper important en la regulació del metabolisme, la resposta a l'estrès i la homeòstasi corporal (Robic et al., 2014).

En el cas de la 11-DHC s'observen tres QTLs significatius, un al SSC4 (123Mb), un al SSC12 (regió 379-381 Mb) i un al SSC7 (al voltant de la regió 115-117 Mb) sent aquest últim més significatiu i gran. Aquest QTL es localitza en la mateixa regió genòmica del QTL del cortisol. El SNP més significatiu es situa exactament en la posició 115,637,801 pb amb un p-valor de 3.06×10^{-09} . En la regió del QTL del SSC7 es troben anotats diversos gens entre ells alguns de la família de les serpins.

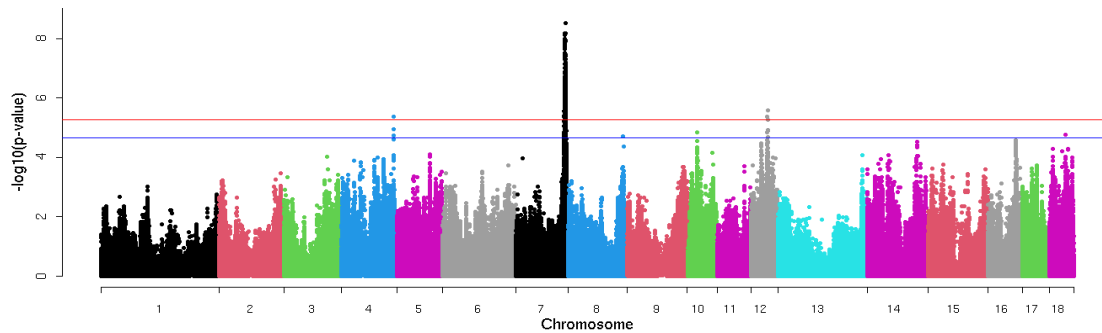


Figura 5. Manhattan plot que representa l'anàlisi d'associació entre els nivells de 11-DHC en plasma i els SNPs distribuïts al llarg del genoma del porc. La línia vermella indica el llindar de significació a nivell genòmic.

Els àcids grassos, a més de les hormones, també exerceixen un paper crucial en el metabolisme, la salut general i la qualitat de la carn. Amb l'objectiu de ampliar el nostre enfocament incloent altres fenotips que puguin influir significativament en la fisiologia i benestar porcí, es va decidir analitzar els GWAS d'alguns àcids grassos.

En un estudi del mateix grup d'investigació, Liu et al (ISAG, 2023) va identificar regions genòmiques associades amb el metabolisme d'àcids grassos en quatre teixits diferents; sang, fetge, teixit adipós i múscul. En aquest estudi es van descriure dos QTLs per a la ràtio C20:4n-6/C20:3n-6 en teixit adipós als cromosomes SSC2 i SSC10. El QTL del SSC2 està comprès entre la posició 7,563,025 pb i la 14,261,411 pb, amb 9,029 polimorfismes en aquesta regió. Els gens candidats en aquesta regió són el *FADS1*, *FADS2*, *FADS3*, *BEST1* i *DAGLA*. El QTL del SSC10 estava comprès entre les posicions 59,635,643 pb i 64,344,350 pb, amb 325 SNPs significatius. El SNP més significatiu és el rs699684228 amb un p-valor de 6.62×10^{-07} . Els gens candidats en aquesta regió són *GATA3* i *ECHDC3*.

En aquest estudi ens vam centrar amb la ràtio entre dos àcids grassos; C20:4n-6/C20:3n-6, un important indicador de la composició lipídica. El C20:4n-6, conegut com a àcid araquidònic, i el C20:3n-6 conegut com a àcid dihomo- γ -linolènic (DGLA), són àcids grassos poliinsaturats de la sèrie omega-6, amb un paper fonamental en la regulació de diverses funcions fisiològiques. Aquesta ràtio és crucial perquè influeix en

la síntesi de molècules senyalitzadores, com els eicosanoides, que participen en processos inflamatoris i altres vies metabòliques essencials per a la salut animal.

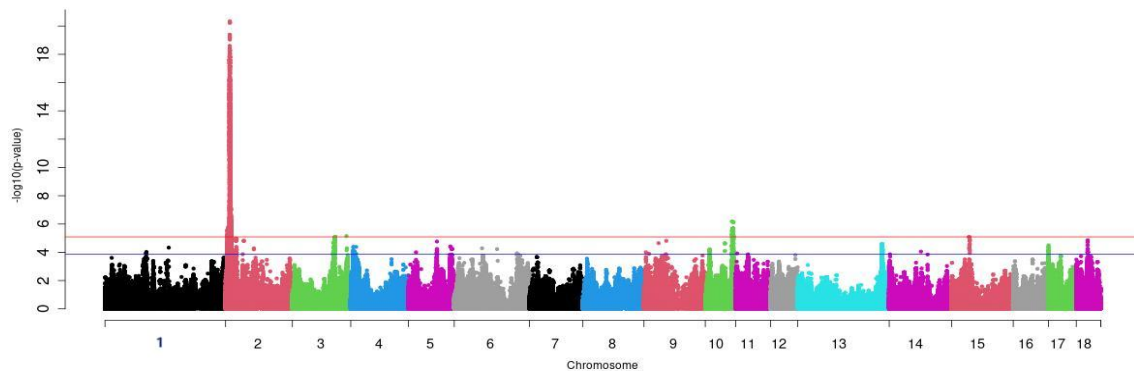


Figura 6. Manhattan plot que representa l'anàlisi d'associació entre la ràtio C20:4n-6/C20:3n-6 en greix dorsal i els SNPs distribuïts al llarg del genoma del porc. La línia vermella indica el llindar de significació a nivell genòmic.

Anàlisi de gens candidats

SERPINA6

Com hem vist anteriorment, s'ha identificat una regió genòmica en el SSC7 associada amb els nivells plasmàtics de cortisol i 11-DHC. En aquesta regió es troben diversos gens de la família de les serpine. Entre aquests gens que podrien esdevenir gens candidats per a la regulació del cortisol, resulta d'especial interès la *SERPINA6*. Aquest gen codifica per a la CBG (corticosteroid-binding globulin), una proteïna que s'expressa majoritàriament en fetge. La CBG és fonamental en el metabolisme del cortisol, ja que s'encarrega del seu transport en la sang i regula la seva biodisponibilitat.

En humans i porcs, s'han descrit variants de la *SERPINA6* associades amb variacions dels nivells de cortisol (Guyonnet-Dupérat et al., 2006; Meyer et al., 2021). La rellevància funcional de la *SERPINA6* i la presència significativa en l'anàlisi de QTL, juntament amb els estudis publicats, justifiquen l'elecció de la *SERPINA6* com a gen candidat.

Anotació *SERPINA6*

El gen *SERPINA6* (ENSSSCG00000002475) s'ubica al SSC7, té una longitud aproximada de 18.8Kb, ocupant les posicions 115,535,697 pb - 115,554,570 pb a la cadena reversa, i presenta dues isoformes diferents, totes dues codificants, segons les últimes dades de l'Ensembl (*Sus scrofa* 11.1)

Els dos transcrits comparteixen els exons 2, 3 i 4. En canvi, presenten diferències en el primer i últim exó (Figura 7).

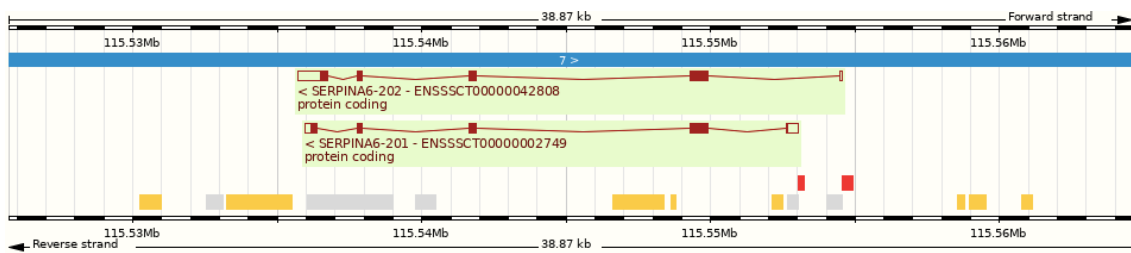


Figura 7. Isoformes de la *SERPINA6* anotades a la base de dades Ensembl (11.1).

Amb la visualització de les dades de transcriptòmica de fetge d'animals de la població d'estudi amb el programa IGV es va observar que el transcrit expressat en aquest material no corresponia exactament a cap dels dos transcrits anotats.

La isoforma expressada en fetge en els nostres animals és una barreja de les dos isoformes anotades a Ensembl; el primer exó correspon al transcrit 202, mentre que l'últim es correspon al transcrit 201, com es pot observar a la Figura 8.

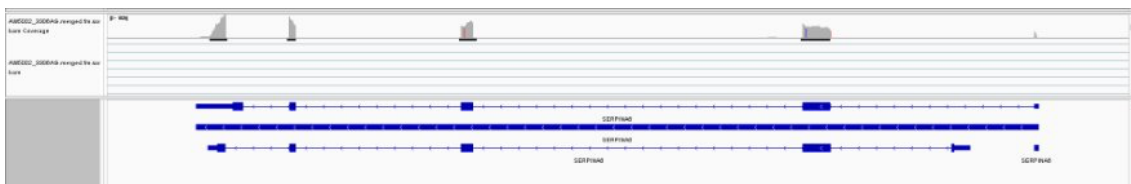


Figura 8. Visualització amb el programa IGV de les dades de RNA-Seq de fetge de la població d'estudi.

L'anotació correcta de la isoforma expressada en el material d'estudi es la que s'indica en la Figura 9. Una anotació correcta i precisa és imprescindible per al correcte estudi del gen.

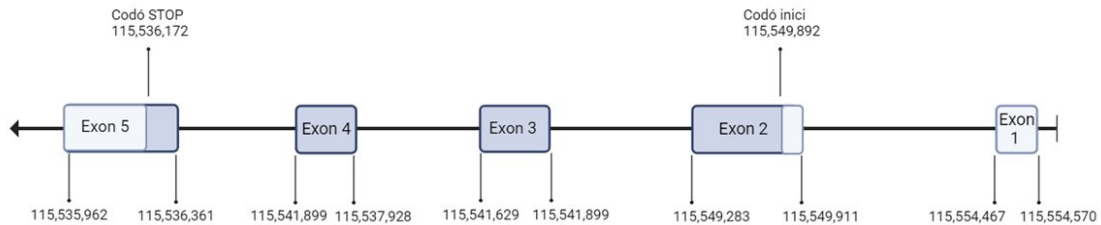


Figura 9. Anotació del gen *SERPINA6* segons les dades de RNA-Seq de fetge de la població d'estudi. La isoforma expressada comença a la posició 115,554,570 pb i finalitza a la posició 115,535,962 pb.

Anàlisi d'expressió del gen *SERPINA6*

Havent seleccionat el gen *SERPINA6* com a gen candidat per a la regulació del cortisol i la 11-DHC, es va dur a terme un anàlisi eGWAS en dades d'expressió del gen en fetge (RNA-Seq de 310 animals; Llobet et al., resultats no publicats) per tal d'identificar regions genòmiques i variants genètiques associades amb les variacions en l'expressió de *SERPINA6*, que puguin estar també implicades en la regulació de les hormones esteroidals.

Analitzant el eGWAS del gen *SERPINA6*, s'observen dos QTLs significatius, un al SSC11, amb només 5 SNPs significatius, i un altre al SSC7, sent aquest el més significatiu (Figura 10). El QTL del SSC7 es situa entre les posicions 114,379,169 – 115,767,423 pb.

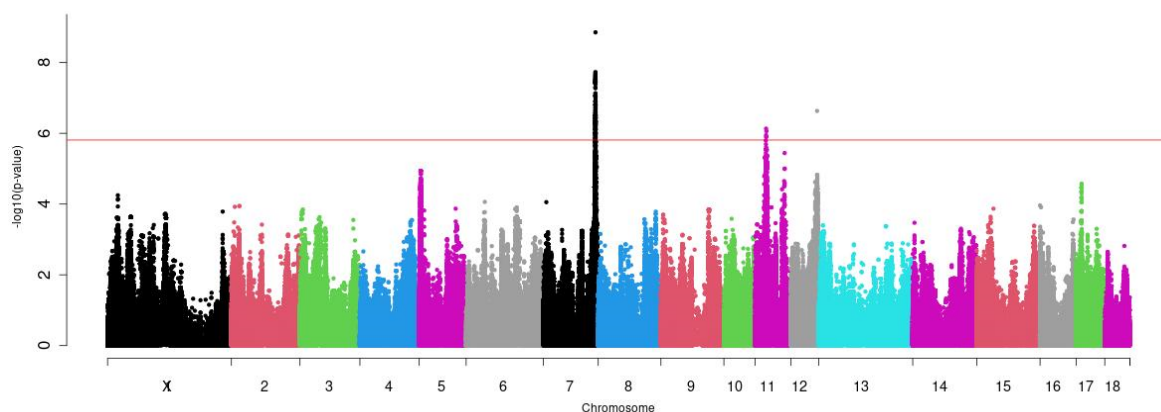


Figura 10. Manhattan plot que representa l'anàlisi d'associació entre els nivells d'expressió de *SERPINA6* i els SNPs distribuïts al llarg del genoma del porc. La línia vermella indica el llindar de significació a nivell genòmic

Com podem veure a la Taula 1, el eQTL de la *SERPINA6* col·localitza amb el QTL del cortisol; aquesta col·localització suggereix una possible associació funcional o reguladora entre els dos *loci* en relació amb els nivells de cortisol i de 11-DHC, el que pot ser important per a la comprensió dels mecanismes genètics subjacents en la regulació dels nivells hormonal de cortisol i 11-DHC. Tot i així, els SNPs més significatius del GWAS del cortisol queden una mica allunyats de la regió de la *SERPINA6*, en sentit aigües avall.

Taula 1. Resultats de GWAS i eGWAS per a Cortisol i *SERPINA6*.

	Regió QTL/ eQTL SSC7	SNP més significatiu	P-VALOR
GWAS Cortisol	109,702,875 - 117,670,828	115,637,925	2.63×10^{-11}
eGWAS SERPINA6	114,379,169 – 115,767,423.	115,787,423	1.40×10^{-09}
GWAS 11-DHC	112,899,089 - 117,473,324	115,637,801	3.06×10^{-09}

Correlació dels nivells d'expressió de la *SERPINA6* amb el cortisol i 11-DHC plasmàtic

Per a comprendre millor la relació entre el gen *SERPINA6* i els nivells de cortisol en la població, es va representar la correlació amb un gràfic de dispersió que mostra els nivells d'expressió de *SERPINA6* en funció del nivell de cortisol i 11-DHC (Figura 11 i 12).

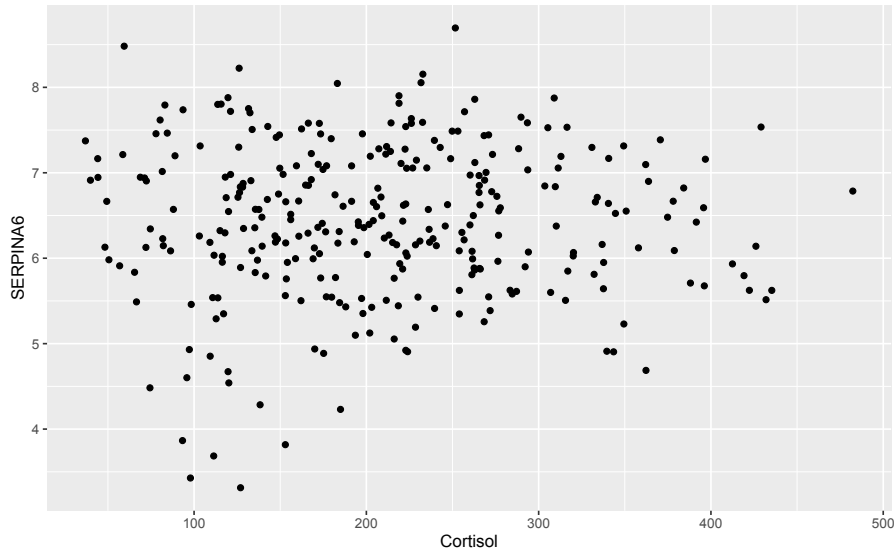


Figura 11. Nivells d'expressió de *SERPINA6* en funció del nivell de cortisol ($r=0.007$, $p\text{-val } 0.89$).

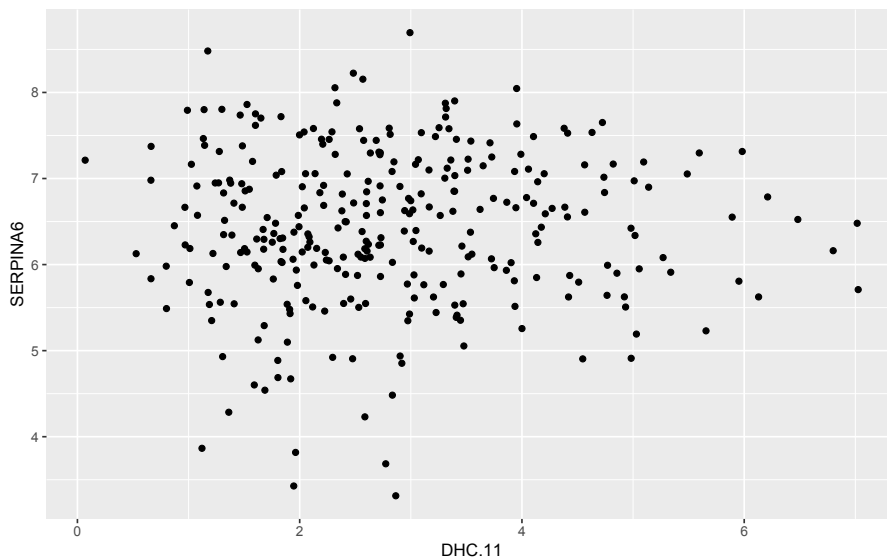


Figura 12. Nivells d'expressió de *SERPINA6* en funció del nivell de 11-DHC ($r=0.02$, $p\text{-val } 0.72$)

El gràfic de dispersió mostra una absència de correlació entre l'expressió del gen *SERPINA6* en fetge i el contingut de les dues hormones en sang, aquesta manca de correlació suggereix que malgrat l'associació en el GWAS per a algunes de les variants

estudiades, la variació en els nivells de cortisol no està directament influïda per la expressió de la *SERPINA6* en fetge, almenys a nivell transcripcional.

La manca de correlació ens porta a considerar que les diferències observades en els nivells de cortisol i 11-DHC podrien ser degudes a mecanismes com la regulació post-transcripcional o post-traduccionals de la proteïna CBG (codificada per el gen *SERPINA6*).

Anàlisi de gens diferencialment expressats

Per tal d'identificar altres gens que puguin estar afectant els nivells de cortisol i 11-DHC es va dur a terme un anàlisi de gens diferencialment expressats (DEG) amb dades de RNA-Seq en fetge d'animals extrems per a cortisol i 11-DHC.

Malauradament, els resultats de l'anàlisi DEG no van mostrar cap gen que complís els criteris de significació establerts. Aquesta absència de gens diferencialment expressats significatius pot ser atribuïda a diversos factors.

Aquests factors poden ser, per exemple, que aquestes hormones estiguin regulades per una xarxa complexa que inclou mecanismes post-transcripcionals, modificacions post-traduccionals i altres influències que no es veuen reflectides en canvis detectables d'expressió gènica (Brown et al., 2023). També pot ser a causa de la interacció entre múltiples gens i vies metabòliques, així com els efectes acumulatius de múltiples QTLs que dilueixen l'efecte de l'expressió diferencial d'un únic gen, fent-lo indetectable amb els criteris de significació utilitzats en el nostre estudi. Aquests resultats reforcen la hipòtesi d'una regulació no transcripcional dels nivells de cortisol en sang.

Tot i no haver identificat gens diferencialment expressats en aquest anàlisi, es va considerar important continuar investigant el gen *SERPINA6* per la seva rellevància funcional i la seva presència significativa en regions QTLs identificades

Anàlisi de les mutacions *missense* en *SERPINA6* i la seva associació amb els nivells de cortisol i 11-DHC

Per tal d'identificar altres mutacions que puguin estar afectant la funció de la *SERPINA6*, el següent pas va ser analitzar totes les mutacions presents en la *SERPINA6* en la població IMMUIGEN. Un cop extretes, aquestes variants es van analitzar mitjançant el Variant Effect Predictor (VEP) amb l'objectiu d'identificar les mutacions amb un possible efecte funcional en el gen.

Amb l'anàlisi VEP es van identificar 176 variants, el 75% de les quals eren variants intròniques. De les variants que es troben en regions codificants, un 42% eren mutacions que resultaven en un canvi aminoacídic (*missense variants*).

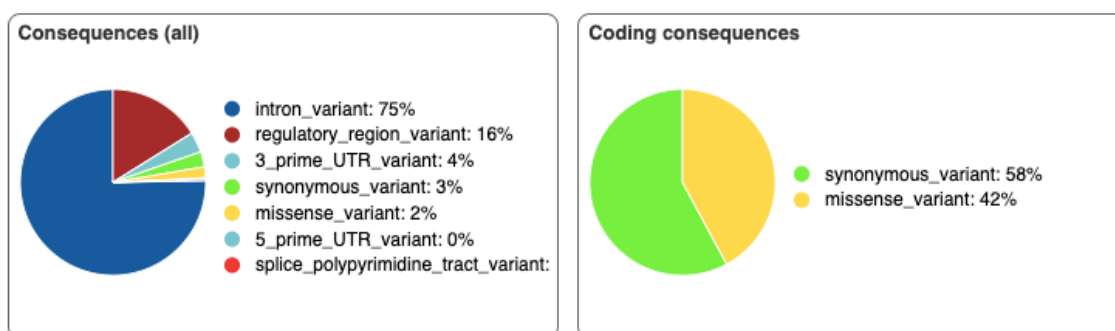


Figura 13. Imatge extreta de l'eina VEP, de la base de dades Ensembl. On es mostra la distribució de les variants de la seqüència analitzada.

De les variants classificades com a *missense variants*, es van filtrar aquelles que estiguessin presents en la isoforma anotada anteriorment, corresponent a la isoforma present a les dades d'expressió en fetge de la població d'estudi. Finalment, es van anotar tres variants que causaven un canvi aminoacídic.

Taula 2. Variants *missense* de la *SERPINA6*

Variant <i>SERPINA6</i>	Localització	Exó	Posició cDNA	Variant existent	Al·lel referència	Al·lel alternatiu
7_115537891_C_T	7:115537891	4/5	1369	rs341520844	T	C
7_115541678_C_T	7:115541678	3/5	1282	rs710124156	C	T
7_115541717_C_T	7:115541717	3/5	1243	rs80896009	T	C

Es va comprovar si aquestes tres variants apareixien entre els SNPs significatius identificats en el eGWAS de la *SERPINA6*, no identificant-se cap d'aquestes variants. A diferència de les variacions genètiques que podrien influir en l'expressió del gen, les mutacions *missense* afecten directament la funció i l'estructura de la proteïna. Per tant, no és sorprenent que aquestes mutacions no apareguin en un GWAS d'expressió.

No obstant, dues de les tres variants classificades com a *missense*, sí que apareixien com a significativament associades en el GWAS de cortisol en plasma, i una d'elles al GWAS de 11-DHC (Taula 3).

Taula 3. Mutacions *SERPINA6* amb el corresponent p-valor GWAS cortisol

Variant <i>SERPINA6</i>	Variant existent	Localització	p-valor GWAS cortisol	p-valor GWAS 11-DHC
7_115537891_C_T	rs341520844	7:115537891	5.40x10 ⁻¹¹	1.51x10 ⁻⁰⁸
7_115541678_C_T	rs710124156	7:115541678	No significatiu	No significatiu
7_115541717_C_T	rs80896009	7:115541717	1.67x10 ⁻⁰⁹	No significatiu

Aquest fet suggereix que aquestes dues variants genètiques, rs341520844 i rs80896009, poden tenir una relació important amb els nivells de cortisol i de 11-DHC a la població estudiada

Per a profunditzar en aquesta associació i validar la rellevància funcional d'aquestes variants es van dur a terme diferents anàlisis addicionals.

Mutació rs341520844

Aquesta mutació es troba a l'exó 4 de la *SERPINA6*. A la seqüència de referència l'al·lel que hi trobem és una citosina, codificant per a l'aminoàcid glicina, i l'al·lel alternatiu correspon a una timina, codificant així per una arginina, en la posició aminoacídica 307 (Taula 4).

Taula 4. Canvi en la seqüència d'ADN i l'aminoàcid codificat per la mutació rs341520844.

	Al·lel	Seqüència reversa	Aminoàcid codificat
Referència	C	5' CCT 3'	Gly
Alternatiu	T	5' TCT 3'	Arg

Dels 432 individus de la població, 71 eren homozigots per a l'al·lel C , 221 individus eren heterozigots i 140 individus homozigots per a l'al·lel T (Taula 5).

Taula 5. Freqüències genotípiques en la població IMMUPIGEN per a la variant rs341520844

Genotip	Nombre individus	Freqüència genotípica
CC	71	0.164
CT	221	0.511
TT	140	0.325
TOTAL	432	1

Després d'obtenir les freqüències genotípiques de la variant rs341520844, el següent pas va ser avaluar l'impacte dels al·lells en els nivells fenotípics de cortisol i 11-DHC. A continuació, s'ha analitzat les dades utilitzant *boxplots* que comparen els nivells de cortisol i 11-DHC entre els diferents genotips (Figures 14 i 15).

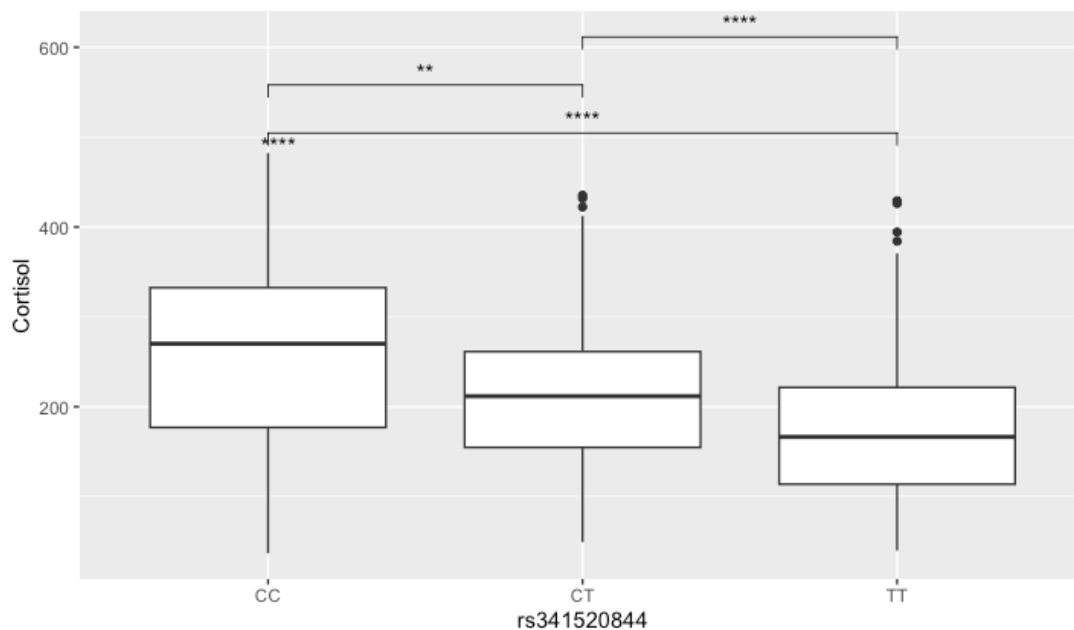


Figura 14. Distribució dels nivells de cortisol en plasma segons el genotip del polimorfisme rs341520844. S'observen diferències significatives entre tots els grups, amb un p-valor de 6.5×10^{-08} entre CC i TT, un p-valor de 2.5×10^{-03} entre CC i CT, i un p-valor de 1.4×10^{-05} entre CT i TT. El p-valor per a les diferències globals es de 7.4×10^{-10} .

Pel que fa a la distribució dels nivells de cortisol entre tota la població segons el genotip del polimorfisme rs341520844, s'observen diferències significatives (p-valor < 0.05) entre els genotips homozigots. Els individus amb el genotip CC, és a dir, aquells individus que tenen una glicina en la posició 307 presenten, en mitjana, uns nivells de cortisol superiors als individus heterozigots o homozigots per a l'al·lel alternatiu. Els individus que tenen l'al·lel alternatiu, és a dir, que codifiquen per a una arginina en la posició 307, són els que presenten els nivells de cortisol més baixos respecte a la població.

Aquests resultats, concorden amb estudis anteriors realitzats per Guyonnet et al (Guyonnet-Dupérat et al., 2006; Ousova et al., 2004), on estudiaven les diferències en nivells de cortisol entre dues poblacions de porcs *Large White* i *Meishan*. En aquest treball, els autors van identificar quatre substitucions aminoacídiques en el gen *SERPINA6*, suggerint que la mutació Arg307Gly incrementa la capacitat d'unió amb el cortisol.

A continuació, es va avaluar l'impacte de la mutació en els nivells fenotípics de la hormona 11-DHC.

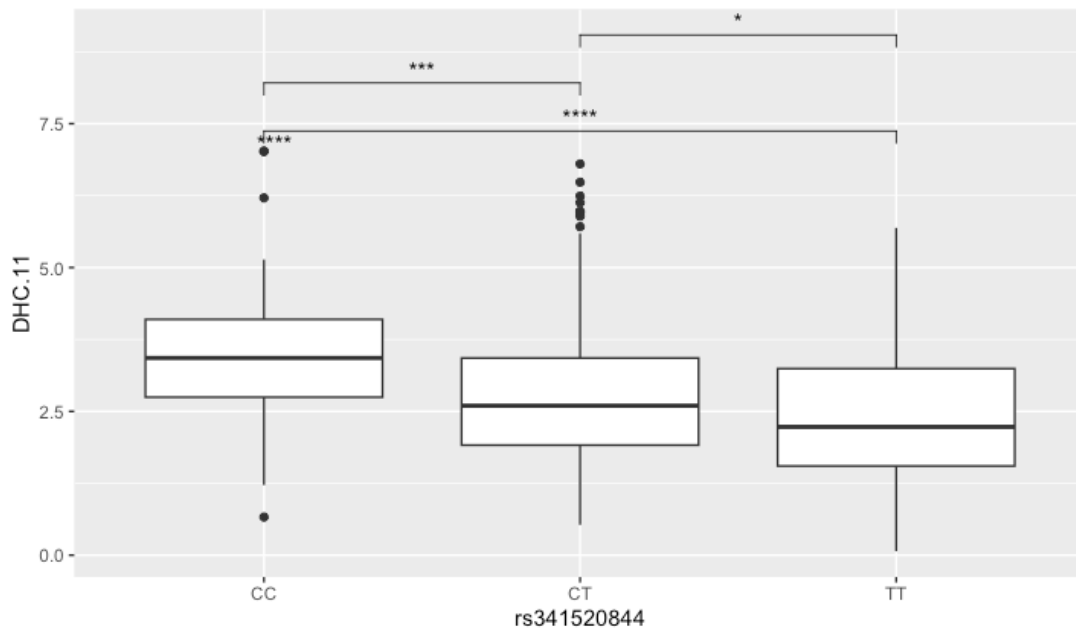


Figura 15. Distribució dels nivells de 11-DHC en plasma segons el genotip del polimorfisme rs341520844. S'observen diferències significatives entre tots els grups, amb un p-valor de 1.9×10^{-07} entre CC i TT, un p-valor de 2.6×10^{-04} entre CC i CT, i un p-valor de 1.1×10^{-02} entre CT i TT. El p-valor per a les diferències globals es de 8×10^{-07} .

La distribució dels nivells de la hormona 11-DHC en plasma segons el genotip del polimorfisme rs341520844 mostra diferències significatives entre tots els grups, com es mostra en la Figura 14.

Els resultats revelen una associació entre els diferents genotips del polimorfisme rs341520844 i els nivells de 11-DHC en plasma. Es va observar que els individus amb el genotip CC, que codifiquen per a una glicina en la posició 307, presenten uns nivells de 11-DHC en plasma més alts en comparació amb els individus heterozigots o homozigots per a l'al·lel alternatiu. A més, els individus que tenen l'al·lel alternatiu, que codifiquen per a una arginina en la posició 307, són els que presenten els nivells de 11-DHC més baixos en comparació amb la població.

Aquesta observació suggereix una possible influència del polimorfisme rs341520844 en la regulació del metabolisme de la hormona 11-DHC en els porcs. La presència de diferents al·lells podria afectar la funció de la proteïna *SERPINA6* i, per tant, influir en la producció o metabolisme de la 11-DHC.

Mutació rs80896009

La mutació *missense* rs80896009 del gen *SERPINA6* també apareixia com a mutació significativa en el GWAS del cortisol, tot i que amb un nivell de significació més baix que la mutació rs341520844 (Taula 2).

Aquesta, es troba a l'exó 3 de la *SERPINA6*. A la seqüència de referència l'al·lel que hi trobem es una citosina, codificant per a l'aminoàcid valina, i l'al·lel alternatiu correspon a una timina, codificant per a una isoleucina, en la posició 265 (Taula 6).

Taula 6. Canvi en la seqüència d'ADN i l'aminoàcid codificat per la mutació rs80896009

	Al·lel	Seqüència reversa	Aminoàcid codificat
Referència	C	5' CAG 3'	Val
Alternatiu	T	5' TAG 3'	Ile

Dels 432 individus de la població, 53 eren homozigots per a l'al·lel C, 203 individus eren heterozigots i 176 individus homozigots per a l'al·lel T (Taula 7).

Taula 7. Freqüències genotípiques en la població IMMUPIGEN per a la variant rs80896009

Genotip	Nombre individus	Freqüència genotípica
CC	53	0.123
CT	203	0.469
TT	176	0.408
TOTAL	432	1

Després d'obtenir les freqüències genotípiques, el següent pas ha estat avaluar l'impacte de la variant en els nivells fenotípics de cortisol per tal de determinar si existeixen diferències significatives associades als diferents genotips. A continuació, s'ha analitzat les dades utilitzant *boxplots* que comparen els nivells de cortisol entre els diferents genotips.

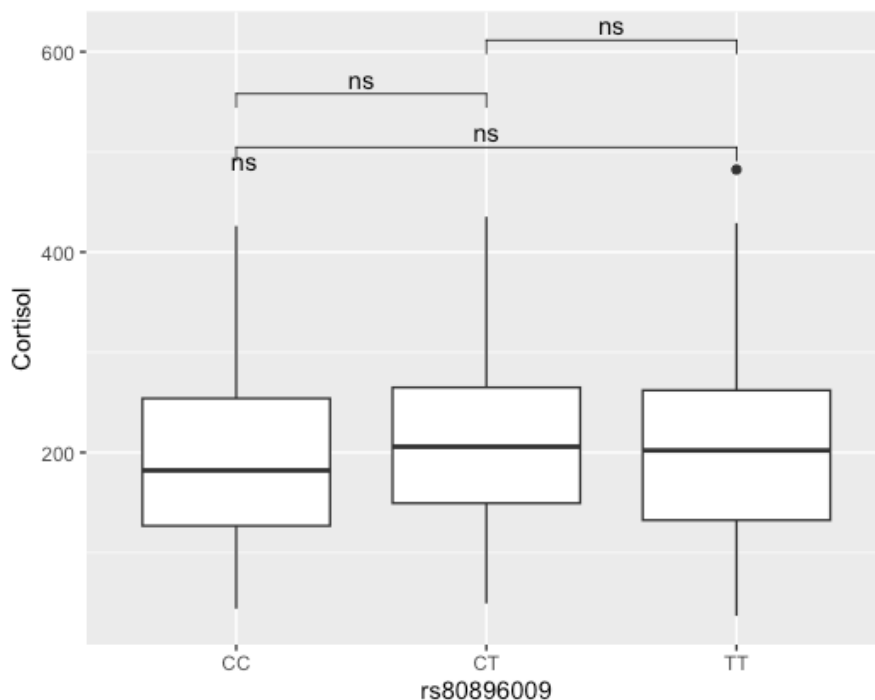


Figura 16. Distribució dels nivells de cortisol en plasma segons el genotip del polimorfisme rs80896009.

En aquest cas, no s'observen diferències significatives entre els nivells de cortisol en plasma i els genotips del polimorfisme rs80896009.

Quantificació del nivell de proteïna CBG en plasma

Per tal d'estudiar el possible efecte de les mutacions no sinònimes identificades en el gen CBG en la funció de la proteïna, es va decidir realitzar un anàlisi ELISA per a la *SERPINA6* (CBG) en plasma. Aquest enfocament proporcionarà una comprensió més completa del paper del gen respecte als nivells de cortisol dels animals estudiats.

Els animals seleccionats amb fenotip extrem pels nivells de cortisol alts van presentar, en mitjana, una concentració de CBG de 154.35 ng/ μ L, mentre que els del grup amb fenotip extrem pels nivells de cortisol baixos van mostrar una concentració mitjana de CBG de 214.07 ng/ μ L. Sorprenentment, els animals amb majors nivells de cortisol tenien nivells inferiors de CBG, i aquesta diferència va ser estadísticament significativa (p-valor 0.049). A la Figura 17 es mostren gràficament els resultats entre els animals amb fenotip extrem de nivell de cortisol.

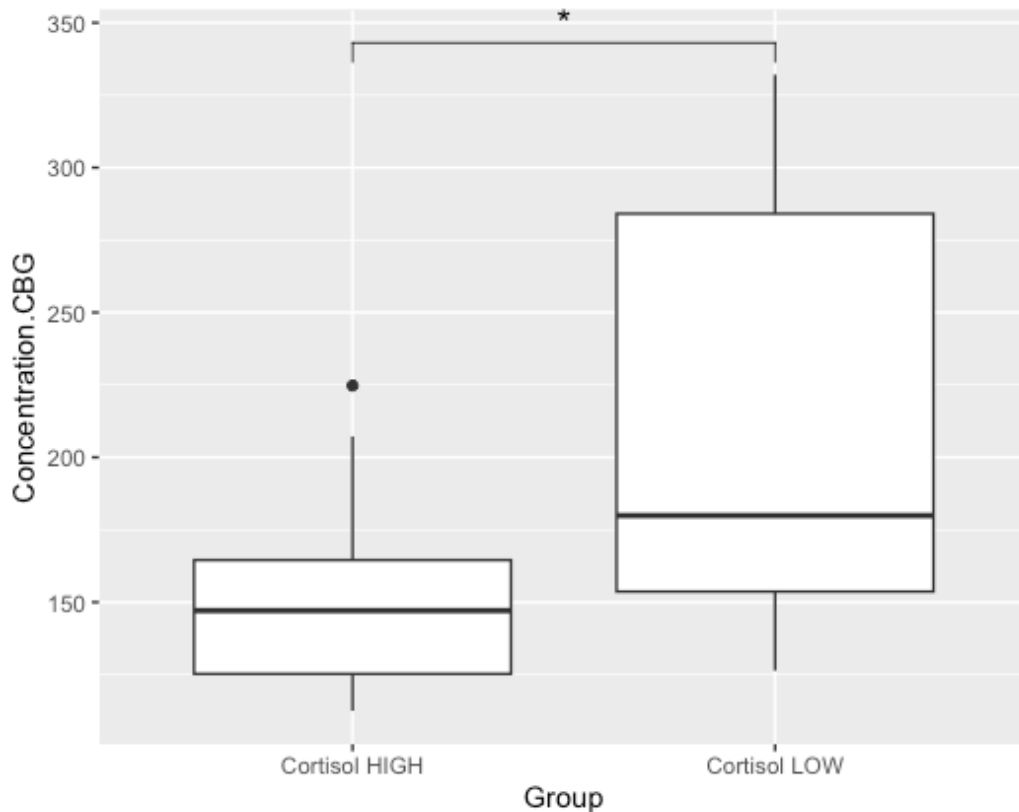


Figura 17. Concentració de la proteïna CBG en animals seleccionats per fenotip extrem de cortisol. Els animals amb valors extrems alts de cortisol mostren diferències significatives (p-valor 0.049) amb els animals amb valors extrems baixos de cortisol.

Els animals seleccionats per alta expressió de *SERPINA6* van mostrar una concentració mitjana de CBG de 254.14 ng/ μ L, mentre que els animals del grup seleccionats per baixa expressió de *SERPINA6* van mostrar una concentració mitjana de 378.85 ng/ μ L. Aquesta diferència també va ser estadísticament significativa (p-valor 0.04), com s'observa a la Figura 18.

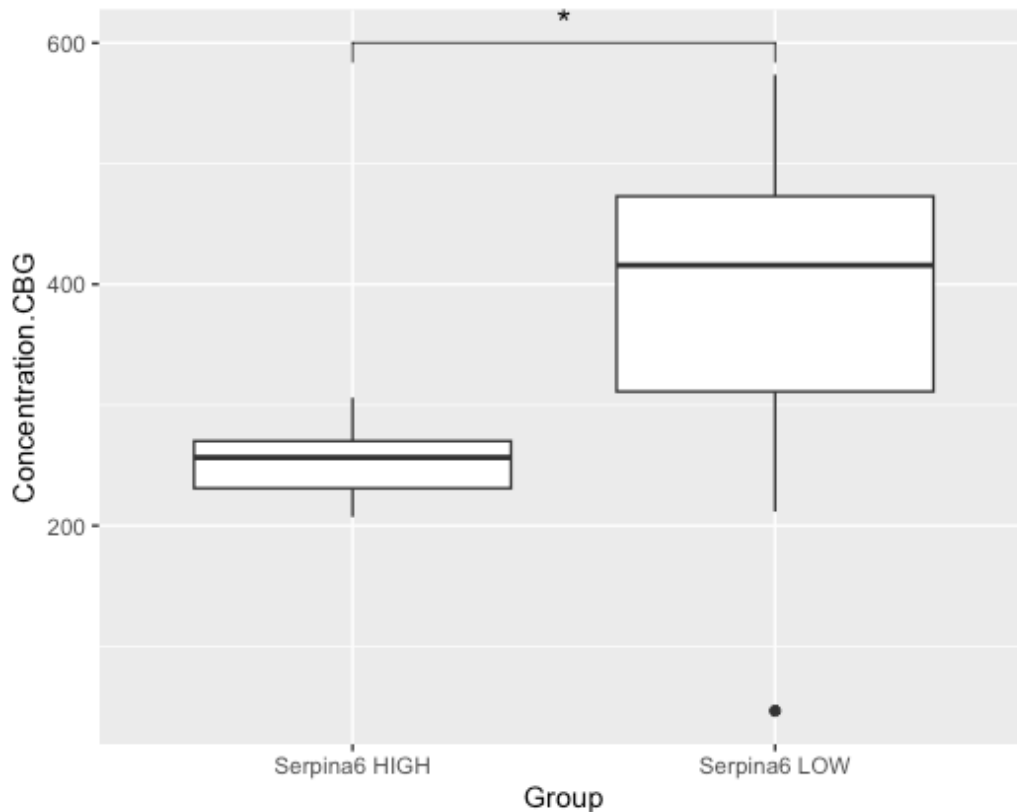


Figura 18. Concentració de la proteïna CBG en animals seleccionats per fenotip extrem d'expressió de *SERPINA6*. Els animals amb valors extrems alts d'expressió mostren diferències significatives (p-valor 0.04) amb els animals amb valors extrems baixos d'expressió.

Els resultats obtinguts han estat sorprenents, ja que el CBG, codificat pel gen *SERPINA6*, és responsable del transport del cortisol. En conseqüència, esperaríem que una major expressió de *SERPINA6* en el fetge comportés una major concentració de CBG a la sang, i per tant, una concentració més elevada de cortisol. No obstant això, els resultats van mostrar una relació inversa entre la expressió transcripcional (mRNA) de la *SERPINA6* en fetge i la quantitat de proteïna CBG en plasma.

Pel que fa a *SERPINA6*, és possible que hi hagi mecanismes de regulació negativa que limitin l'expressió transcripcional del gen o l'estabilitat del mRNA quan els nivells de la proteïna CBG en plasma son elevats. A més, s'ha de considerar que la sang es va extreure a 60 dies d'edat i el fetge al sacrifici del animal. Per tant, la regulació genètica de l'expressió transcripcional de la *SERPINA6* al fetge en el moment del sacrifici del animal potser diferent a la del contingut de CBG en plasma d'animals més joves. Un altre possible explicació d'aquest resultat podria ser que la mesura s'hagi centrat en el cortisol

lliure en lloc del cortisol total. Recordem que el CBG és responsable de transportar del cortisol, i la majoria del cortisol es troba unit al CBG. Així, si la mesura es centra en el cortisol lliure, aquest pot reflectir una menor quantitat de CBG disponible, ja que la major part del cortisol estaria lligada al CBG. Per tant, aquesta discrepància podria ser deguda a la metodologia de mesura del cortisol.

Els resultats d'aquest estudi suggereixen una complexitat inesperada en la relació entre l'expressió de *SERPINA6*, la concentració de CBG i els nivells de cortisol. Es necessita una revisió més profunda de la metodologia de mesura del cortisol per comprendre millor aquesta interacció.

El *GATA3* és el segon gen candidat del nostre anàlisi. Aquest gen apareix com a possible candidat en el QTL associat a la ràtio de C20:4n-6/C20:3n-6 en teixit adipós.

Donada la manca de dades de RNA-Seq en teixit adipós per la població d'estudi, es va optar per utilitzar la tècnica de qPCR per avaluar l'expressió del gen *GATA3* en animals amb fenotips extrems per al ràtio C20:4n-6/C20:3n-6. La qPCR és una tècnica sensible i precisa que permet la quantificació relativa de l'expressió gènica, aquesta tècnica és especialment útil en situacions on no es disposa de dades de RNA-Seq, ja que ofereix una alternativa fiable per a l'anàlisi de l'expressió gènica en mostres específiques.

Per a la quantificació de l'expressió del gen *GATA3*, es va avaluar la idoneïtat de tres possibles gens endògens: *ACTB*, *HPRT1* i *B2M*, gens comunament utilitzats com a controls endògens en experiments de qPCR en porcí degut a la seva expressió estable en varietat de teixits i condicions (Ballester et al., 2017; Revilla et al., 2018). Utilitzant el software de Thermo Fisher Cloud, es van calcular els *scores* de cada gen per determinar-ne l'estabilitat i adequació com a controls. Els gens que presentaven *scores* més baixos, indicant una major estabilitat en l'expressió de les mostres, van ser els gens *ACTB* i *B2M*, seleccionant-los com a controls endògens per a la normalització de les dades.

Per a la quantificació de l'expressió del gen *GATA3*, es va establir com a grup de referència el grup d'animals amb nivells més baixos en la ràtio C20:4n-6/C20:3n-6 (grup *Low*).

La Figura 18 mostren els valors d'expressió del gen *GATA3* dels dos grups. Com s'observa, el grup "High" presenta una RQ major que el grup "Low". També observem un error estàndard força gran, indicant una variabilitat elevada entre les mostres d'un mateix grup. L'estudi de qPCR es va fer amb un total de tan sols 12 animals, degut al filtrat qualitatiu que es va fer de les extraccions de RNA d'aquestes mostres.

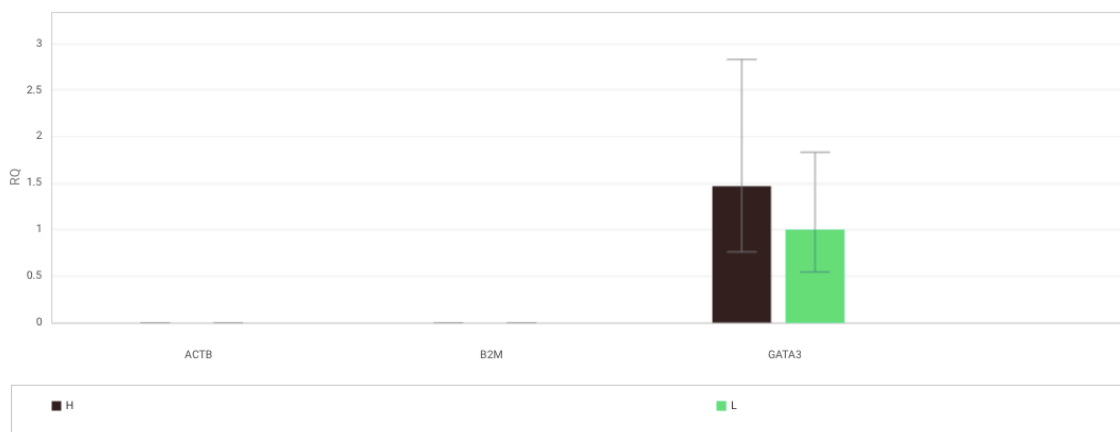


Figura 19. Comparació entre grups dels valors mitjans d'expressió del gen *GATA3* utilitzant el grup "Low" com a calibrador.

Amb aquests resultats, no s'observen diferències estadísticament significatives en l'expressió del gen *GATA3* entre els grups H i L dels àcids grassos C20:4n-6/C20:3n-6.

La mida petita de la mostra pot haver limitat la capacitat de detectar diferències significatives en l'expressió gènica entre els dos grups. El sexe dels animals, així com el lot de sacrifici també podria determinar diferències en el fenotip. Per tant, és important continuar investigant per determinar si l'expressió del gen té una relació directa amb els fenotips estudiats, utilitzant mètodes addicionals i ampliant la mida de la mostra per aconseguir resultats més robustos.

CONCLUSIONS

- S'ha identificat un QTL significatiu al cromosoma SSC7 associat amb els nivells de cortisol i 11-dehydrocorticosterona (11-DHC) en plasma, que inclou el gen candidat *SERPINA6*.
- S'ha identificat un eQTL en el cromosoma SSC7 per l'expressió en fetge de la *SERPINA6*, que col·localitza amb els QTLs de cortisol i 11-DHC.
- No s'ha detectat una correlació entre els nivells d'expressió transcripcional del gen *SERPINA6* en fetge i els nivells de cortisol en plasma, suggerint una regulació post-transcripcional o post-traducciona del gen.
- La mutació no sinònima Arg307Gly (rs341520844) de la *SERPINA6* està associada significativament amb els nivells de cortisol i 11-DHC a la població d'estudi.
- Els nivells de CBG en plasma van mostrar una relació inversa amb l'expressió del gen *SERPINA6* en fetge.
- S'ha identificat un QTL significatiu al SSC10 associat amb els nivells de la ràtio C20:4n-6/C20:3n-6 en teixit adipós, que inclou el gen candidat *GATA3*.
- No hi ha diferències significatives en l'expressió en teixit adipós del gen *GATA3* entre animals amb fenotips extrems per a la ràtio C20:4n-6/C20:3n-6.

Andersson, L., Haley, C. S., Ellegren, H., Knott, S. A., Johansson, M., Andersson, K., Andersson-Eklund, L., Edfors-Lilja, I., Fredholm, M., & Hansson, I. (1994). Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5154), 1771–1774. <https://doi.org/10.1126/science.8134840>

European Parliamentary Research Service. (2020). The impact of COVID-19 on the Internal Market [PDF]. Retrieved from [https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2020/652044/EPRS_BRI\(2020\)_652044_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2020/652044/EPRS_BRI(2020)_652044_EN.pdf)

Ballester, M., Ramayo-Caldas, Y., Revilla, M., Corominas, J., Castelló, A., Estellé, J., Fernández, A. I., & Folch, J. M. (2017). Integration of liver gene co-expression networks and eGWAs analyses highlighted candidate regulators implicated in lipid metabolism in pigs. *Scientific reports*, 7, 46539. <https://doi.org/10.1038/srep46539>

Ballester, M., Ramayo-Caldas, Y., González-Rodríguez, O., Pascual, M., Reixach, J., Díaz, M., Blanc, F., López-Serrano, S., Tibau, J., & Quintanilla, R. (2020). Genetic parameters and associated genomic regions for global immunocompetence and other health-related traits in pigs. *Scientific reports*, 10(1), 18462. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75417-7>

Romo-Valdez, J., Silva-Hidalgo, G., Güémez-Gaxiola, H., Romo-Valdez, A., & Romo-Rubio, J. (2022). Estrés por calor: influencia sobre la fisiología, comportamiento productivo y reproductivo del cerdo [Heat stress: influence on the physiology, productive and reproductive performance of the pig]. *Abanico Veterinario*, 12(1), 1-19. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.37>

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

Brown, A. A., Fernandez-Tajes, J. J., Hong, M. G., Brorsson, C. A., Koivula, R. W., Davtian, D., Dupuis, T., Sartori, A., Michalettou, T. D., Forgie, I. M., Adam, J., Allin, K. H., Caiazzo, R., Cederberg, H., De Masi, F., Elders, P. J. M., Giordano, G. N., Haid, M., Hansen, T., Hansen, T. H., ... Viñuela, A. (2023). Genetic analysis of blood molecular phenotypes reveals common properties in the regulatory networks affecting complex traits. *Nature communications*, *14*(1), 5062. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40569-3>

Corominas, J., Marchesi, J. A., Puig-Oliveras, A., Revilla, M., Estellé, J., Alves, E., Folch, J. M., & Ballester, M. (2015). Epigenetic regulation of the ELOVL6 gene is associated with a major QTL effect on fatty acid composition in pigs. *Genetics, selection, evolution : GSE*, *47*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0111-y>

Crespo-Piazuelo, D., Ramayo-Caldas, Y., González-Rodríguez, O., Pascual, M., Quintanilla, R., & Ballester, M. (2021). A Co-Association Network Analysis Reveals Putative Regulators for Health-Related Traits in Pigs. *Frontiers in immunology*, *12*, 784978. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.784978>

Elenkov, I. J., Webster, E. L., Torpy, D. J., & Chrousos, G. P. (1999). Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *876*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07618.x>

Faggion, S., Boschi, E., Veroneze, R., Carnier, P., & Bonfatti, V. (2023). Genomic Prediction and Genome-Wide Association Study for Boar Taint Compounds. *Animals : an open access journal from MDPI*, *13*(15), 2450. <https://doi.org/10.3390/ani13152450>

Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J. A., Fernández, S., & Rodríguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutrition research reviews*, *27*(1), 63–93. <https://doi.org/10.1017/S095442241400002X>

Gao, G., Gao, N., Li, S., Kuang, W., Zhu, L., Jiang, W., Yu, W., Guo, J., Li, Z., Yang, C., & Zhao, Y. (2021). Genome-Wide Association Study of Meat Quality Traits in a Three-Way Crossbred Commercial Pig Population. *Frontiers in genetics*, *12*, 614087. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.614087>

Generalitat de Catalunya. (n.d.). Sector porcí. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. Recuperado el 21 de junio de 2024, de <https://agricultura.gencat.cat/ca/departament/estadistiques/ramaderia/sectors-ramaders/porci/index.html>

Groenen, M. A., Archibald, A. L., Uenishi, H., Tuggle, C. K., Takeuchi, Y., Rothschild, M. F., Rogel-Gaillard, C., Park, C., Milan, D., Megens, H. J., Li, S., Larkin, D. M., Kim, H., Frantz, L. A., Caccamo, M., Ahn, H., Aken, B. L., Anselmo, A., Anthon, C., Auvil, L., ... Schook, L. B. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, *491*(7424), 393–398. <https://doi.org/10.1038/nature11622>

Guyonnet-Dupérat, V., Geverink, N., Plastow, G. S., Evans, G., Ousova, O., Croisetière, C., Foury, A., Richard, E., Mormède, P., & Moisan, M. P. (2006). Functional implication of an Arg307Gly substitution in corticosteroid-binding globulin, a candidate gene for a quantitative trait locus associated with cortisol variability and obesity in pig. *Genetics*, *173*(4), 2143–2149. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.053983>

Henley, D., Lightman, S., & Carrell, R. (2016). Cortisol and CBG - Getting cortisol to the right place at the right time. *Pharmacology & therapeutics*, *166*, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.020>

Hernandez-Patlan, D., Tellez-Isaias, G., Hernandez-Velasco, X., & Solis-Cruz, B. (2023). Editorial: Technological strategies to improve animal health and production. *Frontiers in veterinary science*, *10*, 1206170. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1206170>

Hu, Z. L., Dracheva, S., Jang, W., Maglott, D., Bastiaansen, J., Rothschild, M. F., & Reecy, J. M. (2005). A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, *16*(10), 792–800. <https://doi.org/10.1007/s00335-005-0060-9>

Larzul, C., Terenina, E., Foury, A., Billon, Y., Louveau, I., Merlot, E., & Mormede, P. (2015). The cortisol response to ACTH in pigs, heritability and influence of corticosteroid-

binding globulin. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 9(12), 1929–1934. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001767>

Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado, C. J., Langendorf, C. G., Pike, R. N., Bird, P. I., & Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome biology*, 7(5), 216. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-5-216>

Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., & Yeung, S. (2019). Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and animal science*, 7, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lopez, B. I., Santiago, K. G., Lee, D., Cho, Y., Lim, D., & Seo, K. (2020). Single-Step Genomic Evaluation for Meat Quality Traits, Sensory Characteristics, and Fatty-Acid Composition in Duroc Pigs. *Genes*, 11(9), 1062. <https://doi.org/10.3390/genes11091062>

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Maradonna, F., & Carnevali, O. (2018). Lipid Metabolism Alteration by Endocrine Disruptors in Animal Models: An Overview. *Frontiers in endocrinology*, 9, 654. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00654>

Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., et al. (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D933-D941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac958>

McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior*, *43*(1), 2–15. [https://doi.org/10.1016/s0018-506x\(02\)00024-7](https://doi.org/10.1016/s0018-506x(02)00024-7)

Meyer, E. J., Spangenberg, L., Ramírez, M. J., De Sousa, S. M. C., Raggio, V., & Torpy, D. J. (2021). CBG Montevideo: A Clinically Novel *SERPINA6* Mutation Leading to Haploinsufficiency of Corticosteroid-binding Globulin. *Journal of the Endocrine Society*, *5*(9), bvab115. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab115>

Miller, R. K. (2002). *Meat Processing: Factors Affecting the Quality of Raw Meat*. Woodhead Publishing Limited. <http://dx.doi.org/10.1533/9781855736665.1.27>

Millet, S., & Maertens, L. (2011). The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: from challenges to opportunities. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, *187*(2), 143–144. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.001>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2022). Indicadores económicos del sector porcino 2022 [PDF]. Recuperado de https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectorporcino2022_tcm30-564427.pdf.

Nong, Q., Wang, L., Zhou, Y., Sun, Y., Chen, W., Xie, J., Zhu, X., & Shan, T. (2020). Low Dietary n-6/n-3 PUFA Ratio Regulates Meat Quality, Reduces Triglyceride Content, and Improves Fatty Acid Composition of Meat in Heigai Pigs. *Animals : an open access journal from MDPI*, *10*(9), 1543. <https://doi.org/10.3390/ani10091543>

Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., & Matuszewski, Ł. (2020). Last Call for Replacement of Antimicrobials in Animal Production: Modern Challenges, Opportunities, and Potential Solutions. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *9*(12), 883. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120883>.

Osorio, J. H., Vinasco Rodríguez, J., & Bedoya, P. A. (2013). Actualización en el metabolismo de las hormonas tiroideas y su relación con la reproducción en el cerdo [Update on the thyroid hormones metabolism and its relationship with boar reproduction]. *Biosalud*, *12*(2), julio-diciembre. ISSN 1657-9550.

Ousova, O., Guyonnet-Duperat, V., Iannuccelli, N., Bidanel, J. P., Milan, D., Genêt, C., Llamas, B., Yerle, M., Gellin, J., Chardon, P., Emptoz-Bonneton, A., Pugeat, M., Mormède, P., & Moisan, M. P. (2004). Corticosteroid binding globulin: a new target for cortisol-driven obesity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, *18*(7), 1687–1696. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0005>

Poklukar, K., Čandek-Potokar, M., Batorek Lukač, N., Tomažin, U., & Škrlep, M. (2020). Lipid Deposition and Metabolism in Local and Modern Pig Breeds: A Review. *Animals : an open access journal from MDPI*, *10*(3), 424. <https://doi.org/10.3390/ani10030424>

Puig-Oliveras, A., Ramayo-Caldas, Y., Corominas, J., Estellé, J., Pérez-Montarelo, D., Hudson, N. J., Casellas, J., Folch, J. M., & Ballester, M. (2014). Differences in muscle transcriptome among pigs phenotypically extreme for fatty acid composition. *PLoS one*, *9*(6), e99720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099720>

Puig-Oliveras, A., Revilla, M., Castelló, A., Fernández, A. I., Folch, J. M., & Ballester, M. (2016). Expression-based GWAS identifies variants, gene interactions and key regulators affecting intramuscular fatty acid content and composition in porcine meat. *Scientific reports*, *6*, 31803. <https://doi.org/10.1038/srep31803>

Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Esteve-Codina, A., Corominas, J., Castelló, A., Ballester, M., Estellé, J., Ibáñez-Escriche, N., Fernández, A. I., Pérez-Enciso, M., & Folch, J. M. (2012). Liver transcriptome profile in pigs with extreme phenotypes of intramuscular fatty acid composition. *BMC genomics*, *13*, 547. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-547>

Revilla, M., Puig-Oliveras, A., Crespo-Piazuelo, D., Criado-Mesas, L., Castelló, A., Fernández, A. I., Ballester, M., & Folch, J. M. (2018). Expression analysis of candidate genes for fatty acid composition in adipose tissue and identification of regulatory regions. *Scientific reports*, *8*(1), 2045. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20473-3>

Robic, A., Faraut, T., & Prunier, A. (2014). Pathways and genes involved in steroid hormone metabolism in male pigs: a review and update. *The Journal of steroid*

biochemistry and molecular biology, 140, 44–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.11.001>

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–140.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

Tempel, D. L., & Leibowitz, S. F. (1994). Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *Journal of neuroendocrinology*, 6(5), 479–501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00611.x>

Torpy, D. J., Bachmann, A. W., Grice, J. E., Fitzgerald, S. P., Phillips, P. J., Whitworth, J. A., & Jackson, R. V. (2001). Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(8), 3692–3700.
<https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7724>

Torpy, D. J., Lundgren, B. A., Ho, J. T., Lewis, J. G., Scott, H. S., & Mericq, V. (2012). CBG Santiago: a novel CBG mutation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(1), E151–E155. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2022>

Valdés-Hernández, J., Ramayo-Caldas, Y., Passols, M., Sebastià, C., Criado-Mesas, L., Crespo-Piazuelo, D., Esteve-Codina, A., Castelló, A., Sánchez, A., & Folch, J. M. (2023). Global analysis of the association between pig muscle fatty acid composition and gene expression using RNA-Seq. *Scientific reports*, 13(1), 535.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-27016-x>

Wang, L., Xie, Y., Chen, W., Zhang, Y., & Zeng, Y. (2022). Identification and functional prediction of long noncoding RNAs related to intramuscular fat content in Laiwu pigs. *Animal bioscience*, 35(1), 115–125. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0092>

Wang, X., Han, X., & Powell, C. A. (2022). Lipids and genes: Regulatory roles of lipids in RNA expression. *Clinical and translational medicine*, 12(5), e863. <https://doi.org/10.1002/ctm2.863>

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., & Nute, G. R. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4), 343-358. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>

Yirgu, M., Kebede, M., Feyissa, T., Lakew, B., Woldeyohannes, A. B., & Fikere, M. (2023). Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for genetic diversity and population structure study in Ethiopian barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm. *BMC genomic data*, 24(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12863-023-01109-6>